



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

EAP. DE MEDICINA VETERINARIA

**Enfermedades bacterianas de importancia en Tilapias sp.
(Oreochromis sp) de cultivo**

TESINA

Para optar el Título de Médico Veterinario

AUTOR

Yessica Lisette Ortega Asencios

LIMA – PERÚ
2011

Dedicatoria

A mis padres; Genoveva y Walter por la formación y el sacrificio que representó el hacernos crecer y brindarnos lo mejor de sí mismos. Su más grande orgullo, el hacernos profesionales... Hoy gratamente, puedo decirles que parte de este sueño, sus cuatro hijos lo han cumplido.

Por sus mejores enseñanzas, como ellos siempre dicen: Las cosas que se consiguen con esfuerzo, son las que más gratificaciones nos brindan.

Porque hoy en día, su apoyo y sus consejos son una de las mejores lecciones de vida.

A mis hermanos; Javier y Dora, por formar parte de mi ejemplo, sus consejos y su apoyo; a Susan; porque aún siendo la más pequeña, se aprende mucho de ella...

Porque los cuatro somos producto del esfuerzo de nuestros queridos padres.

Agradecimientos:

A Dios, gracias por todo lo que me brindas. Gracias por guiar e iluminar mi camino...

A la Dra Nieves, pues en este corto tiempo me brindó la oportunidad de aprender e involucrarme en el tema de la acuicultura; por su apoyo, consejos y contagiante entusiasmo durante la realización de este trabajo... Gracias Dra, por compartir su experiencia, su profesionalismo, pero sobre todo por brindarme su Amistad.

A la empresa Ilender Perú, por brindarme la oportunidad de ser parte de su gran familia.

Al Área de Asuntos Regulatorios... al Dr. Iván; por la experiencia de aprendizaje en este campo, por sus consejos y su apoyo durante el desarrollo de este trabajo... Como él dice; debemos cerrar los capítulos en nuestra vida.

A Mauricio, por compartir sus lecciones de vida, tanto personales como profesionales, por sus consejos, por hacer ver mis errores para corregirlos, por ayudarme a dar lo mejor de mí... Pero, sobre todo por su Amistad.

A ambos, pues es un éxito, iniciar mi desarrollo profesional al lado de Ustedes.

A mis amigos, con quienes compartí mi estudio universitario, una de las mejores épocas de mi vida; a Maybee, Jessica, Giuliana, Elizabeth, Rober y Efraín... Gracias por compartir los seis años; entre estudios, risas, alegrías y muchos sueños.

A mi amiga de siempre; Caty... porque a pesar de los años, siempre estás aquí.

A todas las personas que formaron y forman parte de mi vida... Por sus consejos, su apoyo, su amistad, y por sus enseñanzas de vida.

“Hay personas que llegan a nuestra vida y sólo son pasajeras; sin embargo, hay otras que la transforman y se quedan aquí... Para siempre”.

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE APÉNDICES	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1 Aspectos generales de la tilapia	2
2.2 Enfermedades en tilapia	3
III. <i>Aeromonas hydrophila</i>	7
3.1 Características microbiológicas	7
3.2 Epidemiología	7
3.3 Patogenia	8
3.3.1 Ruta de ingreso	8
3.3.2 Factores de virulencia	8
3.3.3 Signos clínicos	11
3.3.4 Lesiones	11
3.4 Diagnóstico	13
3.5 Tratamiento	14
3.6 Prevención y Control	14
IV. <i>Edwardsiella tarda</i>	16
4.1 Características microbiológicas	16
4.2 Epidemiología	16
4.3 Patogenia	17
4.3.1 Ruta de ingreso	17
4.3.2 Factores de virulencia	17
4.3.3 Signos clínicos	19
4.3.4 Lesiones	19
4.4 Diagnóstico	21
4.5 Tratamiento	21
4.6 Prevención y Control	22

V.	<i>Flavobacterium columnare</i>	24
5.1	Características microbiológicas	24
5.2	Epidemiología	24
5.3	Patogenia	24
5.3.1	Ruta de ingreso	24
5.3.2	Factores de virulencia	25
5.3.3	Signos clínicos	25
5.3.4	Lesiones	26
5.4	Diagnóstico	29
5.5	Tratamiento	29
5.6	Prevención y Control	30
VI.	<i>Vibrio vulnificus</i>	31
6.1	Características microbiológicas	31
6.2	Epidemiología	31
6.3	Patogenia	32
6.1.1	Ruta de ingreso	32
6.1.2	Factores de virulencia	32
6.1.3	Signos clínicos	32
6.1.4	Lesiones	33
6.4	Diagnóstico	33
6.5	Tratamiento	33
6.6	Prevención y Control	33
VII.	<i>Francisella asiatica</i>	35
7.1	Características microbiológicas	35
7.2	Epidemiología	35
7.3	Patogenia	37
7.3.1	Ruta de ingreso	37
7.3.2	Factores de virulencia	37
7.3.3	Signos clínicos	38
7.3.4	Lesiones	39
7.4	Diagnóstico	40
7.5	Tratamiento	41
7.6	Prevención y Control	42

VIII.	<i>Streptococcus spp</i>	43
8.1	Características microbiológicas	45
8.2	Epidemiología	46
8.3	Patogenia	47
8.3.1	Ruta de ingreso	47
8.3.2	Factores de virulencia	47
8.3.3	Signos clínicos	50
8.3.4	Lesiones	52
8.4	Diagnóstico	53
8.5	Tratamiento	54
8.6	Prevención y Control	55
IX.	ESTADO SANITARIO DE LA TILAPIA EN EL PAÍS	56
X.	RECOMENDACIONES	58
XI.	LITERATURA CITADA	60
XII.	APÉNDICES	78

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1: Algunos casos de estreptococosis reportados en tilapia de agua dulce cultivada en el continente americano, con sus correspondientes agentes.....	44
Cuadro 2: Principales características fenotípicas diferenciales de varias especies de <i>Streptococcus</i> aisladas de tilapias enfermas en el Continente Americano.....	46
Cuadro 3: Principales manifestaciones clínicas y patológicas causadas por <i>Streptococcus</i> spp. en tilapias enfermas.....	52

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1: <i>Oreochromis</i> spp.....	3
FIGURA 2: Ilustración de la interrelación directa entre el estrés de los peces, salud y enfermedad.....	4
FIGURA 3: Ilustración de los diferentes tipos de estresores, que afectan a los peces.....	4
FIGURA 4: Ulceración externa y necrosis es evidente en estos ejemplos de peces afectados con SHB	6
FIGURA 5: Hallazgos microscópicos por <i>Aeromonas hydrophila</i>	12
FIGURA 6: Hallazgos microscópicos en riñón y corazón por <i>Aeromonas hydrophila</i>	13
FIGURA 7: Lesiones por <i>E. tarda</i> en hígado y riñón.....	20
FIGURA 8: Lesiones por <i>E. tarda</i> en bazo e intestino.....	20
FIGURA 9: Lesiones por <i>E. tarda</i> en branquias y músculo.....	21
FIGURA 10: Lesiones en epitelio por <i>F. columnare</i>	27
FIGURA 11: Lesiones en branquias, hígado y riñón por <i>F. columnare</i>	29
FIGURA 12: Ilustración de supervivencia de <i>Francisella</i> dentro de macrófagos.....	36
FIGURA 13: Transmisión electrónica de barrido de THKDM de tilapias infectadas <i>F. asiatica</i> LADL 07-285 A.....	38
FIGURA 14: Esplenomegalia y renomegalia en tilapia infectado por <i>Francisella</i> spp.....	39
FIGURA 15: Hallazgos histopatológicos de Francisellosis en tilapia nilotica.....	40

FIGURA 16: Microfotografía histológica de un bazo no infectado y un bazo infectado de tilapia.....	40
FIGURA 17: Factores de virulencia de <i>S.iniae</i>	47
FIGURA 18: <i>Streptococcus</i> spp. Signos de enfermedad en tilapia nilotica.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

- SHB:** Síndrome de septicemia hemorrágica bacteriana
- ECPs:** Productos extracelulares
- OMPs:** Proteínas de membrana externa.
- MAb:** Anticuerpos monoclonales
- PAb:** Anticuerpos policlonales
- SOD:** Superóxido dismutasa
- T3SS:** Sistema de secreción tipo III
- VP:** Reacción Voges-Proskauer
- MRS:** caldo Mann Rogosa Sharp
- LAP:** Producción de leucina aminopeptidasa
- CAMP test:** Test para identificar *Streptococcus* grupo B, basado sobre la formación del factor CAMP (que aumenta el área de hemólisis formado por la hemolisina β).
- GAS:** *Streptococcus* grupo A
- SLS:** Streptolisina S
- DNA RAPD:** Amplificación aleatoria de ADN polimórfico
- RFLP:** Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
- AFLP:** Polimorfismos de longitud de fragmentos de amplificación
- GAPDH:** Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
- THKDM:** Macrófagos derivados de la región cefálica del riñón de tilapia
- RSP:** Porcentaje de supervivencia relativa
- ECP:** Epiteoma Papiloso de carpas
- LAMP:** Amplificación isothermal mediada por lazo

LISTA DE APÉNDICES

	Pág.
APÉNDICE 1. Enfermedades y medidas de control en <i>O. niloticus</i> (FAO, 2006).....	78
APÉNDICE 2. Drogas aprobadas para uso en acuicultura (U.S. Fish & Wildlife Service, 2008).....	79

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de tilapias es una actividad de creciente desarrollo en nuestro país, representando una excelente alternativa comercial. Es por ello, que resulta importante identificar los agentes patógenos que podrían ocasionar pérdidas económicas en esta especie. Dentro de ellos se encuentran las enfermedades bacterianas, que pueden ocasionar mortalidad masiva de peces cultivados.

Los agentes bacterianos muchas veces son parte de la flora normal; sin embargo, diversos factores, pueden desencadenar la susceptibilidad de los peces y por ende, la infección.

Muchas de las enfermedades en peces, representan un riesgo para la salud pública, por su carácter zoonótico; resulta pues importante identificar los agentes involucrados, reportar la enfermedad y establecer medidas de control sanitario y zoosanitario.

El objetivo del presente trabajo es ser una fuente recopilada de información sobre los principales agentes bacterianos que afectan las tilapias en cultivo, y contribuir de esta manera al desarrollo de futuras investigaciones.

II. ANTECEDENTES

2.1. Aspectos generales de la Tilapia

Tilapia es el nombre común con el cual se conocen a diversas especies de los géneros *Oreochromis* y *Tilapia*, pertenece a la familia de los cíclidos. Las Tilapias son peces de agua dulce endémicos y originarios de África y el Cercano Oriente, aprovechando sus características y adaptabilidad, a comienzos del siglo XIX se inician las investigaciones para utilizarlas en la piscicultura rural, especialmente en el Congo Belga (actualmente Zaire). A partir de 1924 se intensifica su cultivo en Kenia, sin embargo fue en el Extremo Oriente, en Malasia en donde se obtuvieron los mejores resultados y se inicia su progresivo cultivo en diferentes partes del mundo (Baltazar, 2007).

En Perú, en la década del 50, la Dirección General de Caza y Pesca del Ministerio de Fomento y Agricultura realizó las primeras introducciones con la especie *Tilapia rendalli*, utilizada como forraje para el paiche (*Arapaima gigas*); en la década de los 70, el IMARPE y la Universidad Nacional Agraria La Molina introdujeron las especies *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis hornorum* y *Oreochromis mossambica* (Ramos y Gálvez, 2000), con fines de investigación y cultivo en las zonas de selva (Baltazar, 2007).

La tilapia constituye la segunda especie en acuicultura de actual importancia en el mundo, y la tercera más importante mercadería de alimento importada dentro de los Estados Unidos, después del camarón marino y el salmón del Atlántico (Sandoval *et al*, 2010).

Entre los más grandes exportadores del producto entero congelado y de filetes congelados encontramos a países de Asia, tales como Taiwán e Indonesia, y para filetes

frescos encontramos a países de Latinoamérica, tales como Costa Rica, Ecuador y Honduras. En todos estos países la exportación de la tilapia se basa en la producción por cultivo bajo diferentes niveles y sistemas de producción, así como en diferentes ambientes (agua dulce, salobre y salada) (Sandoval *et al.*, 2010).

La tilapia tiene una tendencia hacia hábitos alimenticios omnívoros, aceptan fácilmente alimentos elaborados artificialmente. Por otro lado, son especies de crecimiento rápido, toleran altas densidades de siembra, bajas concentraciones de oxígeno, altos niveles de amonio y bajos niveles de pH. Las tilapias prefieren temperaturas elevadas, el rango natural en el que habita oscila entre 20° C – 30° C, aunque pueden soportar temperaturas menores. Las tilapias siendo peces de agua dulce, tienen la capacidad de adaptarse a vivir en aguas saladas (eurihalinas), esta tolerancia permite practicar su cultivo en estanques con agua marina, salobre o dulce y, además, permite aprovechar terreno salitroso poco aptos para la agricultura o pastizales (Baltazar y Palomino, 2004) (Fig. 1).



Figura. 1 *Oreochromis* spp (Baltazar y Palomino, 2004).

La producción de tilapia ofrece mayor rentabilidad respecto a la cría de otras especies, debido a su menor requerimiento de alimentos, por ejemplo la tilapia de Nilo sólo necesita 1.2 kg de comida para producir 1 kg de carne de alto valor nutritivo. Por otro lado destaca su característica de especie poiquiloterma que le permite obtener mayor cantidad de carne al no necesitar mayor energía. (MINCETUR, 2011).

2.2. Enfermedades en tilapia

Generalmente los problemas de salud en los peces, en los de cultivo especialmente, están relacionados directamente al estrés de los peces sobre los factores ambientales (estresores) y alteraciones de su fisiología (Awad, 2010). Así, existe una interrelación directa entre el estrés, la salud y la enfermedad (Schmittou *et al.*, 2004) (Fig. 2).

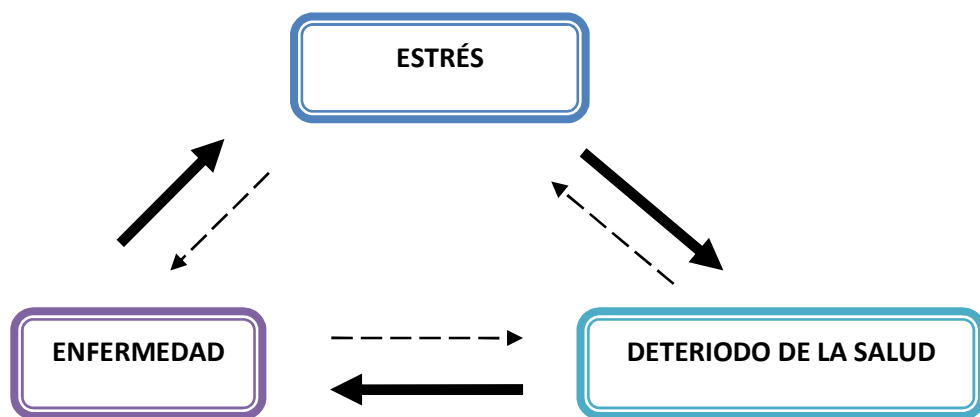


Figura. 2 Ilustración de la interrelación directa entre el estrés, la salud y enfermedad de los peces (Schmittou *et al.*, 2004).

Además, el estrés es considerado el principal factor que afecta la salud de los peces, y puede conducir a enfermedades infecciosas. Los estresores pueden ser agudos o crónicos, y su impacto sobre los peces son aditivos y acumulativos, por lo menos por un corto período (Schmittou *et al.*, 2004). Los estresores pueden ser químicos, biológicos, físicos o de procedimientos (Awad, 2010) (Fig. 3).

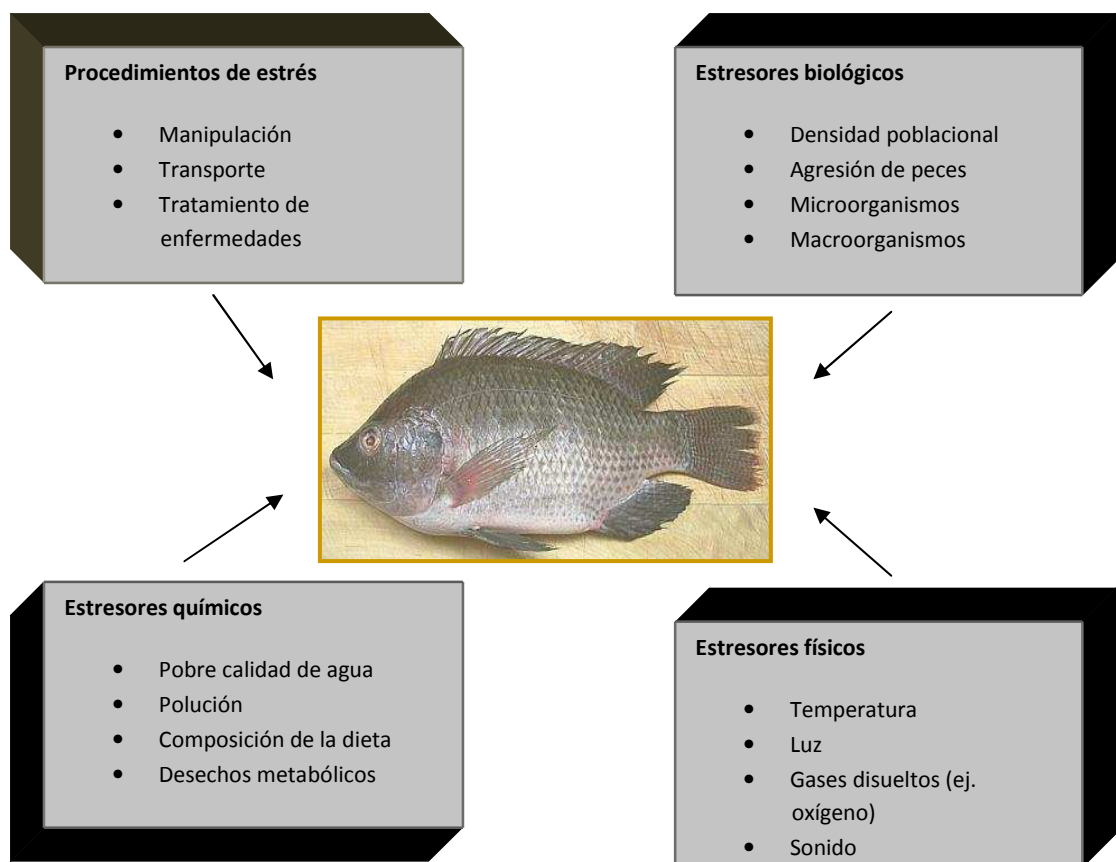


Figura 3. Ilustración de los diferentes tipos de estresores, que afectan a los peces (Awad, 2010).

La tilapia ha sido considerada una especie acuícola muy resistente a enfermedades; sin embargo, en la actualidad este atributo ha sido desacreditado por las numerosas referencias sobre casos de epizootias, algunas muy devastadoras, que se presentan en diferentes partes del mundo (Ariel y Owens, 1997).

Los cultivos de tilapia son afectados por una gran variedad de organismos patógenos: crustáceos, protozoos, hongos, bacterias y virus. Dentro de este grupo, son las bacterias las que producen los mayores perjuicios económicos, siendo las más frecuentes en ambientes dulceacuícolas las siguientes: *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae*, *S. milleri* y *Francisella*; entre otras (Mateo *et al.*, 2011).

Existe una condición patológica asociada con la presencia de diferentes tipos de bacterias que producen signos clínicos similares en peces, denominado síndrome de septicemia hemorrágica bacteriana (SHB). SHB es capaz de producir mortalidades entre 5 a 100% en tilapias cultivadas en ambientes de aguas dulces y saladas (Conroy y Conroy, 2006).

Los tipos bacterianos aislados de ataques de SHB en tilapias; incluyen los siguientes bacilos gramnegativos: *Aeromonas hydrophila* y otras aeromonas móviles, *Edwardsiella tarda*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas fluorescens* y *Vibrio* spp. (Conroy y Conroy, 2006). Infecciones experimentales con *A. hydrophila* y *E. tarda* en tilapias criadas en Colombia, reproducen cuadros similares a la septicemia hemorrágica bacteriana (Vásquez-Piñeros, 2010).

Los signos externos más comunes incluyen áreas hemorrágicas, acompañadas frecuentemente por varios grados de ulceración y necrosis sobre la superficie corporal, base de las aletas pectorales y ventrales, y en la región ocular. Internamente, se observan focos hemorrágicos en el corazón, hígado, riñón y bazo, y sobre la superficie visceral de la cavidad abdominal. Usualmente se presenta necrosis en el corazón, hígado, bazo y músculo esquelético, y particularmente en el tejido hematopoyético de la región cefálica del riñón (Conroy y Conroy, 2006) (Fig.4).



Figura 4. Ulceración externa y necrosis es evidente en estos ejemplos de peces afectados con SHB (Conroy y Conroy, 2006).

Muchas de las bacterias involucradas en casos de SHB son componentes normales de la flora bacteriana de los peces, y del ambiente acuático en el cuál ellos son cultivados (Conroy y Conroy, 2006).

III. *Aeromonas hydrophila*

3.1. Características microbiológicas

Es un cocobacilo gramnegativo, anaerobio facultativo (Rodríguez *et al.*, 2005), no forma esporas (Roberts *et al.*, 1996). De acuerdo a Adams y Moss (2000) y Kirov (2003) la *A. hydrophila* es una bacteria móvil que tiene un solo flagelo polar, catalasa y oxidasa positivo, la cual fermenta glucosa, con o sin la producción de gas, y es insensible a los agentes vibriostáticos 0/129 (2,4-diamino, 6,7-di-isopropyl pteridine). Además produce 2,3-butanediol y reduce nitrato a nitrito (Cipriano, 2001). No es ni tolerante a la sal (<5%) ni al ácido (pH min. 6.0) y crece óptimamente alrededor de 28° C. Tiene la habilidad para crecer a temperaturas frías, habiéndose reportado temperaturas de -0.1° C para algunas cepas (Daskalov, 2006).

3.2. Epidemiología

A. hydrophila ha sido ampliamente estudiada y considerada como la bacteria más importante por causar “aeromonosis, septicemia hemorrágica o septicemia por aeromonas móviles” en peces (Angka *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2000; Rhaman *et al.*, 2001) y otros animales acuáticos tales como ranas (Hird *et al.*, 1983; Huys *et al.*, 2003), camarones (Vivekanandhan *et al.*, 2002), cangrejos (Nielsen *et al.*, 2001) y mejillones (Maki *et al.*, 1998).

A. hydrophila es un habitante normal del agua y el tracto gastrointestinal de animales acuáticos y terrestres (Rodríguez *et al.*, 2005). Sin embargo, bajo condiciones ambientales, tales como cambios abruptos de temperatura, manejo, hacinamiento, inadecuada alimentación y oxígeno, que son factores predisponentes (Leung *et al.*, 1994 y Roberts, 2001), puede iniciar procesos patológicos en peces y mamíferos (Rodríguez *et al.*, 2005).

En el humano se reportan infecciones con *A. hydrophila* que inducen gastroenteritis, meningitis, endocarditis, etc., principalmente en neonatos (Pazzaglia *et al*, 1990; Thomas *et al*, 1990; Begue *et al*, 1994; Falcón *et al*, 2001).

El rol de esta bacteria en incidencias de transmisión alimentaria no está bien establecido. Sin embargo, existen datos que señalan que es posible que *A. hydrophila* asociada con gastroenteritis en humanos, sea capaz de crecer en alimentos a temperaturas en refrigeración, actualmente consideradas adecuadas para prevenir el crecimiento de patógenos de transmisión alimentaria (Daskalov, 2006).

3.3. Patogenia

Un prerrequisito para iniciar la infección es la adhesión e invasión de las células epiteliales del hospedero. *A. hydrophila* es capaz de unirse al colágeno, fibronectina, proteínas del suero y glicoproteínas encontradas en la mucosa y células epiteliales (Atkinson y Trust, 1980; Ascencio *et al.*, 1991; Neves *et al.*, 1994). Se piensa que las adhesinas pueden permitir el anclamiento necesario a la bacteria para facilitar la invasión subsecuente.

Estudios recientes han demostrado la interacción entre varios cultivos de células de peces y *A. hydrophila*, lo cual ha reportado que esta bacteria puede ingresar dentro de las células e inducir cambios morfológicos (Leung *et al.*, 1996; Low *et al.*, 1998).

3.3.1. Ruta de ingreso

Eissa *et al.* (1994) mostraron que la prevalencia de septicemia por aeromonas móviles en tilapias cultivadas y *Tilapia niloticus* silvestre fue de 10% y 2.5%, respectivamente.

Ventura y Grizzle (1987) produjeron infecciones sistémicas más rápidas, en el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) por abrasión de la piel, antes de exponerlo a la bacteria. Estos investigadores demostraron que *A. hydrophila* infecta órganos internos a través del tracto digestivo o a través de piel dañada, bajo condiciones de hacinamiento (13.1 g de pez/L) y altas temperaturas (24° C).

3.3.2. Factores de virulencia

La bacteria posee múltiples factores de virulencia, como los ECPs, los factores de superficie, factores asociados a células, plásmidos y sistemas de restricción/modificación, que parecen desempeñar un papel importante en la patogénesis de la enfermedad en peces. Sin embargo, no se ha logrado esclarecer con exactitud cuál de todos es el que tiene mayor

importancia en el desencadenamiento y desarrollo de la enfermedad (Thune *et al.*, 1986; Khalil y Mansour, 1997).

Tan *et al.* (1998) concluyeron que *A. hydrophila* puede entrar e invadir las células de los peces, y sobrevivir como un parásito intracelular. Ellos estudiaron la interacción entre *A. hydrophila* y EPC, sugiriendo que, existe una vía de señal de transducción que participaría en esta interacción, donde *A. hydrophila* se adhiere a la superficie celular del huésped antes de su internalización. Después de la adhesión, *A. hydrophila* iniciaría una cascada de señales que involucra tirosin-quinasa. Al término de esta vía de señalización, *A. hydrophila* produciría una reorganización de los microfilamentos (actina F) en células EPC para formar nubes de actina. Posteriormente, la bacteria internalizada se replicaría intracelularmente, causando cambios morfológicos en las monocapas de EPC.

Factores de superficie

La microscopía electrónica demostró que las aeromonas móviles producen fimbrias (pilis) que facilitan la adhesión (Cipriano, 2001). Por otro lado, Dooley y Trust (1988) caracterizaron una proteína de superficie tetragonal de 52 kDa (Capa S), esta cubierta penetra a la membrana celular bacteriana, incrementando su hidrofobicidad. Esta superficie de tensión incrementada aumenta la resistencia de la bacteria a la lisis mediado por el complemento y la fagocitosis (Cipriano, 2001).

Factores extracelulares

Muchas aeromonas elaboran un amplio número de enzimas extracelulares que degradan activamente una variedad de complejos de proteínas, polisacáridos, mucopolisacáridos y moléculas conteniendo lípidos (Janda, 1991).

Hemolisinas: Probablemente la característica cultivada más notable expresada por muchas cepas de Aeromonas es su habilidad para hemolizar eritrocitos cuando crecen sobre un medio adecuado. Esta hemolisina, la cual típicamente pertenece a un amplio grupo de citolisinas bacterianas formando poros, causa fugas del contenido del citoplasma de las células diana vía disrupción de la integridad normal de la membrana celular. El resultado final es la muerte, por lisis osmótica o por procesos no osmóticos (Janda, 1991).

Debido a la actividad biológica de las exotoxinas sobre el tejido, se le ha dado gran importancia a la β hemolisina (aerolisina o citotoxina enterotóxica), que según múltiples autores posee actividad hemolítica, enterotóxica y citotóxica (Rodríguez *et al.*, 2005).

En mamíferos, la hemolisina de *A. hydrophila* induce la producción TNF- α e IL-1 β por los macrófagos y células epiteliales del intestino. Esto conduce al aumento de la permeabilidad vascular, causando edema y muerte celular (Cahill, 1990; Chopra y Houston, 1999; Matsche y Grizzle, 1999; Matsuyama e Iida, 1999).

Enterotoxina: Ljungh *et al.* (1982a y 1982b) reportaron la separación y purificación parcial de una enterotoxina que fue distinta a la α y β hemolisina. Esta enterotoxina causa acumulación de fluido en la curva ileal del conejo, con la técnica de intestino ligado, (Dubey y Sanyal, 1979) y da una respuesta positiva a la prueba de piel del conejo. Cuando las células adrenales Y1 fueron expuestas a esta enterotoxina, fue observada una secreción esteroide concomitante, rodeándolas, y los niveles intracelulares de AMP cíclico fueron elevados. Estos resultados colectivos sugieren que esta molécula es una enterotoxina citotónica (Janda, 1991).

La enterotoxina es similar a las aisladas en otras bacterias entéricas causantes de septicemias y gastroenteritis en humanos, y está asociada a infecciones de *A. hydrophila* en humanos teniendo como fuente bacteriana el agua y alimentos contaminados (Albert *et al.*, 2000).

Se han caracterizado tres tipos de enterotoxinas en *A. hydrophila* aislados de infecciones gastrointestinales de humanos: una es citotoxina, mientras que las otras dos son citotónicas, codificadas cada una en sus respectivos genes (*act*, *alt* y *ast*) (Sha *et al.*, 2002).

Proteasas: Son enzimas capaces de separar cadenas de péptidos. Un número de proteasas extracelulares producidas por bacterias gramnegativas, se piensa, juegan un rol importante en la patogénesis y virulencia (Janda, 1991).

Rodríguez *et al.* (1992) han purificado una metaloproteasa, una proteasa sérica y una hemolisina de un cultivo sobrenadante de *A. hydrophila*. Cada uno de ellos tiene una actividad letal en truchas arco iris.

Khalil y Mansour (1997) concluyen y consideran que las exotoxinas, hemolisinas y proteasas de *A. hydrophila* son letales para la tilapia, puesto que cepas con alta producción de ellas son más letales que otras con menor producción.

Sideróforos: Son componentes con bajo peso molecular, con alta afinidad (capacidades ligantes) para varias formas orgánicas e inorgánicas de hierro, particularmente bajo condiciones limitantes de hierro (Crosa, 1989).

3.3.3. Signos clínicos

En peces se describen tres formas de la enfermedad: septicémica; cutánea, con lesiones limitadas a piel y músculo; y una forma latente, que es una forma sistémica sin presentación de signos clínicos (Grizzle y Kiryu, 1993).

El período de incubación de la enfermedad depende de las especies de peces y su resistencia, las condiciones ambientales y la estación. Este período varía de 2 a 4 días en infecciones naturales y de 8 a 48 horas en modelos de infecciones experimentales (Bach, 1978; Huizinga, 1979).

En la forma aguda, puede ocurrir una septicemia fatal rápidamente, el pez muere antes de tener tiempo para desarrollar algunos signos de enfermedad. Cuando los signos clínicos de la infección están presentes, los peces afectados pueden mostrar exoftalmia, enrojecimiento de la piel, y una acumulación de fluido en la escama pockets (Faktorovich, 1969). El abdomen puede llegar a estar distendido como resultado del edema y las escamas pueden estar muy erizadas. Las branquias pueden estar hemorrágicas y pueden desarrollar úlceras sobre la dermis. Otras aeromonas móviles fueron aisladas de los ojos, hígado y riñón de los peces afectados (Cipriano, 2001; Roberts, 2001).

3.3.4. Lesiones

Las infecciones sistémicas fueron caracterizadas por necrosis difusa en varios órganos internos y la presencia de macrófagos conteniendo melanina en la sangre (Ventura y Grizzle, 1987). Internamente, el hígado y los riñones son los órganos blancos de una septicemia aguda. El hígado puede estar pálido o tener una coloración verdosa, mientras el riñón puede llegar a estar inflamado y friable. Estos órganos son atacados aparentemente por las toxinas bacterianas y pierden su integridad estructural (Huizinga *et al.*, 1979; Afifi *et al.*, 2000).

Yardimci y Aydin (2011) (Fig. 5) encontraron microscópicamente que los hallazgos más significativos fueron observados en hígado, riñón y corazón. En el hígado, los sinusoides estuvieron dilatados y el cordón de Remark disociado, se observó necrosis focal en los hepatocitos y células del páncreas, además de vacuolas de forma angulosa en el citoplasma de los hepatocitos.

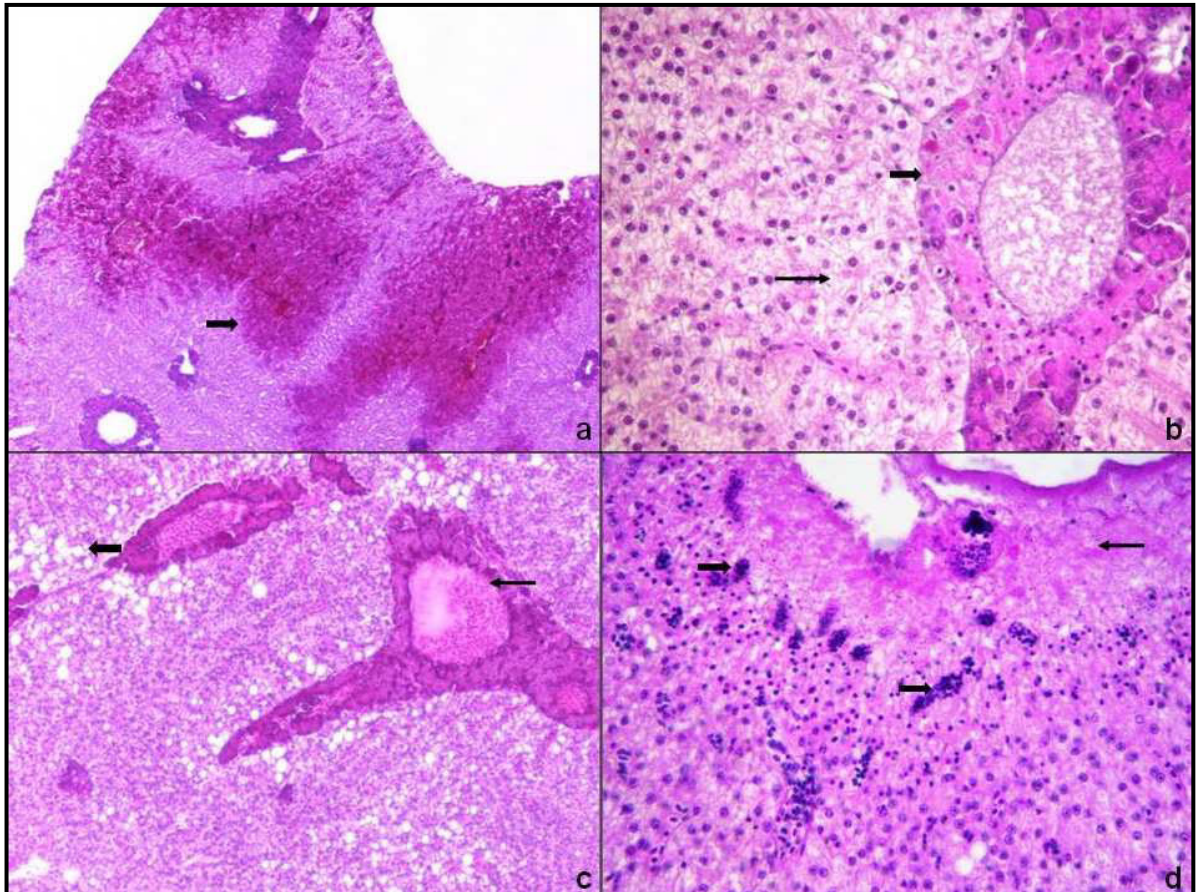


Figura 5. a. Hemorragia en hígado; b. Cambios degenerativos en hígado (flecha delgada) y necrosis de células pancreáticas (flecha gruesa); c. Lipidosis difusa de hígado (flecha gruesa) e hiperemia (flecha delgada); d. Necrosis focal de hepatocitos (flecha delgada), infiltración linfocítica (flecha gruesa) (Yardimci y Aidyn, 2011)

En los riñones se observó hemorragia sub capsular e intersticial, degeneración del parénquima y formación vacuolar citoplasmática, la necrosis del epitelio tubular con infiltración linfocítica se consideró asociada con nefritis intersticial, la cual fue observada en estudios paralelos (Roberts, 2001; Yardimci y Aydin, 2011) (Fig. 6).

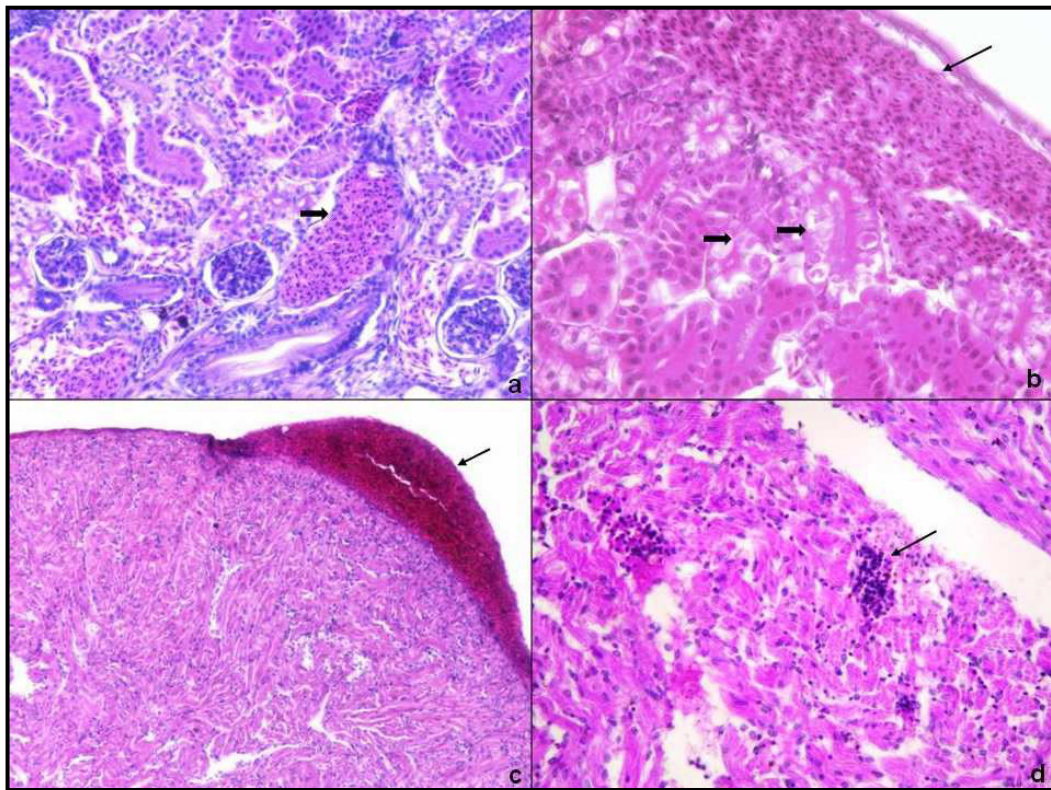


Figura 6. a. Severa hiperemia en riñón (flecha gruesa) y cambios degenerativos en epitelio tubular (flecha delgada); b. Hemorragia en riñón (flecha delgada) y necrosis en epitelio tubular (flecha gruesa); c. Hemorragia pericardial (flecha); d. Infiltración linfocítica entre las fibras del músculo cardíaco (flecha) (Yardimci y Aydin, 2011)

3.4. Diagnóstico

La investigación epidemiológica de *A. hydrophila* se ha visto obstaculizada por la falta de un método de identificación rápida o por complejidades taxonómicas de varios aislamientos (Longyant *et al.*, 2007).

El aislamiento se ha conseguido usando frotis de riñón en medios no selectivos, tales como agar nutriente o agar tripticasa soya (TSA), o medios selectivos, denominado medio Rimler-Shotts (Shotts y Rimler, 1973), incubado por 24 – 48 h a 20 - 25° C. Ambos métodos fenotípicos y serológicos son usados en el diagnóstico (Austin y Austin, 2007). La fermentación de la glucosa es considerada como una reacción crítica usada en la identificación de *A. hydrophila* (Cipriano, 2001).

Recientemente, los inmunoensayos y métodos moleculares que utilizan las sondas de ADN o PCR han demostrado su utilidad para la detección directa de microorganismos presentes en muestras clínicas (Oakey *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000). Los inmunoensayos

basados en anticuerpos monoclonales (Mab), son en general indispensables para la detección de agentes etiológicos y diversas etapas de la enfermedad.

Para el diagnóstico se puede utilizar además, anticuerpos policlonales (PAb) específicos contra *A. hydrophila* (Sendra *et al.*, 1997; Swain *et al.*, 2002), o para estudiar el papel de los flagelos en la invasión bacteriana (Merino *et al.*, 1997). Sin embargo, los Pab podrían dar un resultado falso positivo y un antecedente no específico de la reacción antígeno-anticuerpo, sobre todo en la caracterización de epítopes de los antígenos diana. Por el contrario, Mab específico para *A. hydrophila* ha sido caracterizado contra el LPS de aislados de *A. hydrophila* tipo I (Cartwright *et al.*, 1994), y también contra una proteína de 110 kDa de *A. hydrophila* con baja reactividad cruzada con otras especies de *Aeromonas* y varias especies bacterianas (Delamare *et al.*, 2002).

3.5. Tratamiento

Jongjareanjai *et al.* (2009) encontraron que el cloranfenicol fue el antibiótico más efectivo para inhibir el crecimiento de *A. hydrophila*, siendo la primera droga de elección; seguido por sulfametoxazol – trimetoprim y amikacina. Por el contrario, reportaron 100% de resistencia para metronidazol y colistina, mientras la penicilina y amoxicilina mostraron similar resistencia (92,31%). Por lo general, las drogas de elección para el tratamiento de infecciones en animales acuáticos son la enrofloxacin y oxitetraciclina, sin embargo este estudio mostró que la enrofloxacin (37.04% sensible; 51.85% resistente) tiene poca eficacia para eliminar la bacteria.

3.6. Prevención y Control

Existen diversos estudios sobre aislamientos de *A. hydrophila*, altamente resistentes a algunos antibióticos, aplicados en la práctica clínica, lo cual puede generar dificultad para curar la enfermedad causada por esta bacteria (Daskalov, 2006). Por esta razón, en la actualidad hay una tendencia a desarrollar otras propuestas, incluyendo vacunas, probióticos e inmunoestimulantes, para el control de enfermedades en peces (Awad, 2010).

Se está investigando sobre los antígenos altamente inmunogénicos que produzcan anticuerpos específicos para varias especies y/o cepas de *Aeromonas*. Un fragmento de 747 pb de la OMP de la bacteria altamente conservada (nombrado como Omp-G), que fue altamente conservada en siete secuencias de *Aeromonas* de la base de datos NCBI, fue amplificado por PCR a partir de una cepa de *A. sobria* (B10) y dos cepas de *A. hydrophila* (B27 y B33) con los cebadores específicos diseñados y vectorizado en *E. coli* para

obtener una proteína recombinante que fue probada como antígeno determinando una buena inmunogenicidad en las anguilas, produciendo un aumento significativo de anticuerpos (Ruizhang *et al.*, 2011).

Entre los estudios realizados con tilapia utilizando bacterias ácido lácticas como probióticos se encuentra el de Poot-Poot (2001), quién aisló e identificó bacterias ácido lácticas del tracto intestinal de la tilapia nilótica bajo condiciones de cultivo. El género dominante encontrado fue el de *Enterococcus*, de éstos, la especie *Enterococcus durans* presentó acción inhibitoria *in vitro* contra dos bacterias patógenas *Aeromonas hydrophila* y *Spingomonas paucimobilis*.

Por otro lado, Lara-Flores (2003) realizó un estudio con el objetivo de identificar bacterias ácido lácticas como posibles probióticos de la flora nativa de la tilapia nilótica. De las bacterias aisladas, *Streptococcus* spp. se presentó como el microorganismo nativo más viable a utilizarse como probiótico en dietas para tilapia debido a los resultados positivos que obtuvo en bioensayos de crecimiento. Así mismo, observó una disminución en el estrés y un efecto benéfico sobre el medio ambiente de cultivo al disminuir los microorganismos patógenos circundantes.

El uso de lactoferrina como inmunoestimulante en tilapia nilótica mostró resistencia significativa a *A. hydrophila* después de alimentarlas con 600 mg de lactoferrina / kg. Además hubo un incremento en la actividad inmune específica y no específica, conteo linfocítico, estallido respiratorio, lisozima del suero y las actividades bactericidas contra *A. hydrophila* con adición de lactoferrina a las dietas (El- Ashram y El-boshy, 2008).

Actualmente, se han iniciado estudios para determinar la factibilidad de usar hierbas medicinales en el manejo de las enfermedades en peces, en la medida que estos productos con frecuencia no tienen efectos secundarios y son biodegradables. Además las materias primas son económicas, disponibles localmente, y pueden ser preparadas fácilmente (Harikrishnan y Balasundaram, 2005).

La tilapia nilótica mostró aumento de la actividad fagocítica después de la administración de extracto de *Astragalus* por una semana (Yin *et al.*, 2006; Ardo *et al.*, 2008). También, carpas alimentadas con *Astragalus* mostraron aumento del estallido respiratorio, actividades fagocíticas, lisozima y aumento de la supervivencia comparado al grupo control, desafiados con *A. hydrophila* (Yin *et al.*, 2009).

IV. *Edwardsiella tarda*

4.1. Características microbiológicas

Es una bacteria gramnegativa, de la familia *Enterobacteriaceae*, móvil, corta, de 1 µm de diámetro y 2- 3 µm de largo, que afecta un amplio rango de hospederos incluyendo peces de agua dulce, como salada (Thune *et al.*, 1993).

E. tarda es anaerobio facultativo y mesófilo (Holt *et al.*, 1994), caracterizado como citocromo oxidasa negativo, indol positivo y además, es un productor intenso de H₂S en la naturaleza. *E. tarda* forma típicas colonias verdes con centros blancos sobre el medio de agar Rimler-Shott (Acharya *et al.*, 2007).

4.2. Epidemiología

E. tarda es considerado un organismo ubicuo y ha sido identificado en hospederos animales y en muestras ambientales de agua y sedimentos a nivel mundial. El reservorio natural de *E. tarda* es considerado el tracto gastrointestinal de los animales, la deposición de sus heces permite la diseminación del organismo dentro del ecosistema y la infección es más probable que se produzca a través del epitelio dañado y el intestino (Plumb y Evans, 2006).

Los reptiles y anfibios han sido identificados como importantes reservorios de la bacteria *E. tarda*, siendo aislada de serpientes, lagartos, caimanes y tortugas, así como de ranas y sapos (Wiedenmayer, 2006). Los pájaros también son reconocidos como portadores esenciales de la bacteria y pueden ser un componente integral en la diseminación (Wiedenmayer, 2006). White *et al.* (1973) reportaron la presencia de *E. tarda* en varias especies de aves acuáticas tales como el pelícano marrón. La *E. tarda* también es capaz de infectar una variedad de especies mamíferas, la presencia de este organismo ha sido reportada en monos (Kourany *et al.*, 1977), ganado (Ewing *et al.*, 1965), cerdos (Owens *et al.*, 1974) y

mamíferos marinos incluyendo el león marino y la marsopa (Wallace *et al.*, 1966; Coles *et al.*, 1978).

Diversos estudios señalan que las variaciones de las condiciones ambientales (ej. salinidad y temperatura) impactan sobre la virulencia de la bacteria (Darwish *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2004). Yasunobu *et al.* (2006) sugirieron que la actividad hemaglutinante y la expresión de una proteína fimbrial de 19.3 kDa son incrementadas con altas concentraciones de NaCl y la virulencia de *E. tarda* aumenta.

E. tarda es considerado un patógeno oportunista muy amplio, y aunque el inicio de la septicemia no es necesariamente crítico, la adición de estresores ambientales como fluctuaciones de temperatura, grado de calidad de agua, y hacinamiento pueden incrementar la incidencia y severidad de la enfermedad en los peces (Meyer y Bullock, 1973; Plumb, 1999). Plumb y Evans (2006) reportaron un rango óptimo de temperatura aproximadamente entre 20° C - 30° C, para la transmisión de la septicemia por *Edwardsiella* en peces.

Es importante considerar el impacto zoonótico de esta bacteria, diversos investigadores reportan que, la exposición al ecosistema acuático o sus habitantes parecen ser los precursores de una enfermedad por *E. tarda* (Wiedenmayer, 2006). Además es considerado un patógeno de transmisión alimentaria, el consumo de pescado crudo o manipulado de manera inadecuada o productos del mar procesados en ambientes contaminados, pueden conducir a la enfermedad (Berg y Anderson, 1972; Meyer y Bullock, 1973; Wyatt *et al.*, 1979; Van Damme y Vandepitte, 1980; Slaven *et al.*, 2001).

4.3. Patogenia

4.3.1. Ruta de ingreso

El tracto gastrointestinal, las branquias y la superficie corporal de los peces son los sitios de entrada de *E. tarda* virulenta (Ling *et al.*, 2001).

4.3.2. Factores de virulencia

La patogénesis de *E. tarda* es multifactorial. Janda *et al.* (1991) ilustraron la habilidad de la bacteria para adherirse y replicarse dentro de monocapas de células epiteliales de líneas HEp-2. La invasión fue reportada ser dependiente de microfilamentos. Asimismo, Phillips *et al.* (1998) mediante microscopía electrónica mostraron que *E. tarda* induce la formación de proyecciones extensivas sobre la membrana plasmática de células HEp-2.

La capacidad del patógeno para infectar sus hospederos es parcialmente debido a su habilidad para detoxificar varias formas tóxicas de oxígeno (O_2 , O_2 , H_2O_2 y OH_2) presentes en el huésped, por la producción de enzimas, tales como peróxido catalasa y superóxido dismutasa (SOD) (Mohanty y Sahoo, 2007). Yamada y Wakabayashi (1999) identificaron el gen SOD (*sodB*) de *E. tarda*.

Srinivasa Rao *et al.* (2003) reportaron 14 genes (derivados de 15 mutantes TnphoA) que son importantes en la patogénesis de *E. tarda*, los cuales codifican para factores de virulencia homólogos para transportadores de fosfato, proteínas reguladoras del sistema de secreción, enzimas como catalasa y glutamato decarboxilasa, proteínas fimbriales y dos nuevas proteínas.

El gen *fimA* de la bacteria es responsable de la adherencia al hospedero para la invasión (Mohanty y Sahoo, 2007). Dentro del hospedero, la bacteria lucha contra el suero y la muerte mediada por fagocitos, los cuales son realizados con los genes *gadB*, *isor*, *katB*, *ompS2* y *ssrB*. Los genes *pst* y *asta* ayudan a adquirir nutrientes tales como fosfato y hierro dentro del hospedero, que la bacteria necesita para su proliferación (Mohanty y Sahoo, 2007).

Shen y Chen (2005) también observaron la expresión de genes virulentos (*hlyA*, *citC*, *fimA*, *gadB*, *katB* y *mukF*) correlacionados con la mortalidad de peces infectados con *E. tarda*.

Han *et al.* (2006) reportaron que las cepas virulentas poseen los genes tipo I *sodB* y *katB*, mientras que cepas avirulentas tienen el tipo II *sodB*, pero no *katB*. Esto sugiere que la habilidad de *E. tarda* para resistir la actividad del complemento y fagocitosis, es por la presencia de superóxido dismutasa y catalasa (Mohanty y Sahoo, 2007).

Por otro lado, las estructuras de la superficie celular, como lipopolisacáridos y péptidoglucanos también ayudan a la bacteria a superar el ambiente hostil dentro del hospedero (Matthew *et al.*, 2001). *E. tarda* también posee un sistema de adquisición de hierro, mediado por sideróforos (Kokubo *et al.*, 1990).

Estudios recientes han encontrado que *E. tarda* puede inyectar una proteína tóxica dentro de las células huésped por medio de sistema de secreción T3SS (Srinivasa Rao *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2005).

La hemolisina y dermatoxinas producidas por la mayoría de cepas de esta bacteria son responsables del mayor daño (Ullah y Arai, 1983a,b; Suprpto *et al.*, 1996; Hirono *et al.*, 1997). Aranishi y Mano (2000) reportaron que durante la infección aumentó el nivel usual de catepsinas de la piel, indicadoras de actividad antibacteriana.

4.3.3. Signos clínicos

El-Yazeed y Ibrahim (2009) reprodujeron la infección experimental de *E. tarda* en tilapia nilotica, inyectaron vía IM e IP; 0.3 mL de suspensión bacteriana conteniendo 10⁸ UFC /ml. Observaron varios signos clínicos, incluyendo movimientos lentos y pérdida de los reflejos de defensa y escape. Sintomáticamente, reportaron desprendimiento de las escamas y coloración pálida, tumefacción edematosa severa en el sitio de la inyección, presencia de abdomen abalonado con fluido ascítico amarillento, ano hemorrágico protruido y opacidad de ambos ojos.

En infecciones leves, la sola manifestación de la enfermedad son lesiones cutáneas pequeñas (3-5 mm de diámetro) localizadas sobre las partes posterolaterales del cuerpo. Como la enfermedad progresa, los abscesos desarrollan dentro de los músculos sobre los flancos o pedúnculo caudal. Estos abscesos rápidamente incrementan en tamaño y se desarrollan dentro de grandes cavidades llenas de gas, y que en estado agudo, son visibles como áreas convexas e inflamadas (Mohanty y Sahoo, 2007). Si la lesión es incidida, un olor fétido es emitido y se puede observar restos de tejido necrótico completando las cavidades (Wiedenmayer, 2010). Cuando la infección progresa, los peces afectados pierden el control sobre la mitad posterior del cuerpo (Mohanty y Sahoo, 2007).

4.3.4. Lesiones

Las características histopatológicas de la septicemia por *E. tarda* están concentradas en los riñones, hígado, bazo, e intestino. La infección es caracterizada por necrosis licuefactiva, diseminación bacteriana extensa, y la presencia de macrófagos (Wiedenmayer, 2006).

Galal *et al.* (2005) reportaron cambios histopatológicos en *O. niloticus* inoculadas experimentalmente con *E. tarda*, estos cambios fueron degeneración hepática, cambios grasos, y necrosis. En los riñones, observaron necrosis epitelial de los túbulos contorneados y degeneración hidrópica. (Fig. 7)

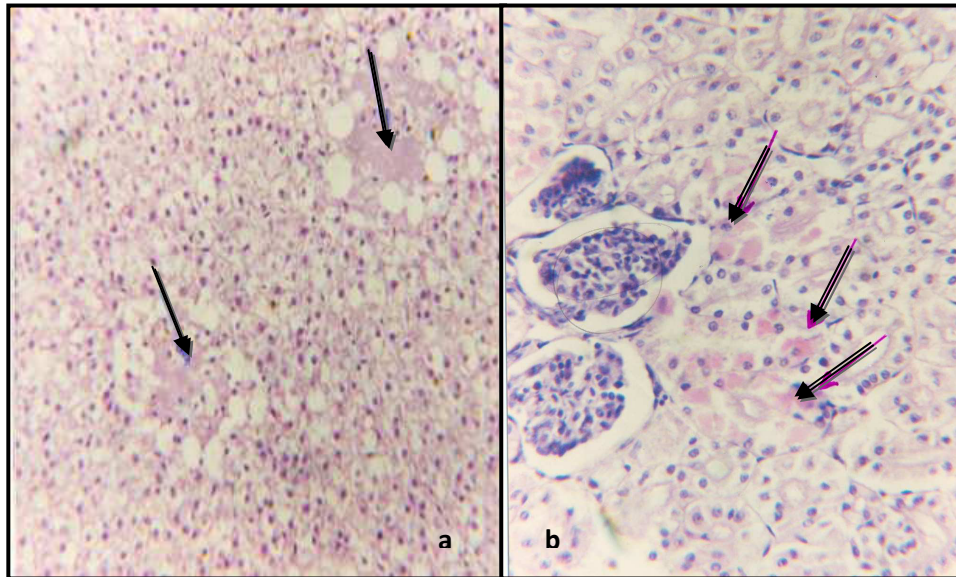


Figura 7. a. Lesiones por *E. tarda* en a. Hígado; b. Riñón. (Galal *et al.*, 2005).

En el bazo observaron activación de centros melanomacrófagos, y depleción linfocítica. En el intestino, hiperplasia de las células mucosas (Galal *et al.*, 2005) (Fig. 8).

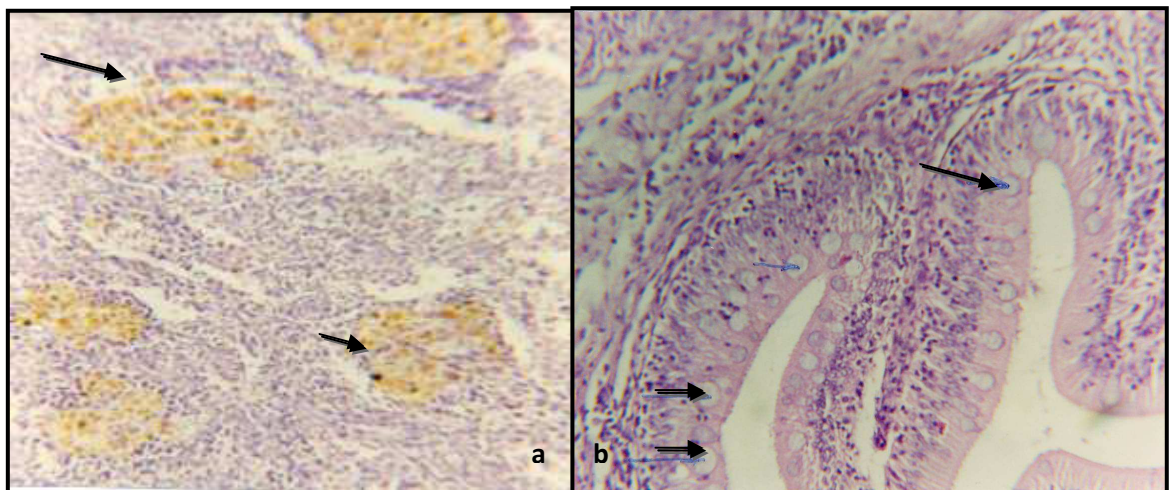


Figura 8. Lesiones por *E. tarda* en a. Bazo; b. Intestino (Galal *et al.*, 2005).

Por otro lado, Galal *et al.* (2005) observaron edema subepitelial sobre la base de las laminillas secundarias de las branquias y telangiectasis. Además de cambios en los músculos en forma de hialinización, sarcoplasmois, edema e infiltración linfocítica (Fig 9).

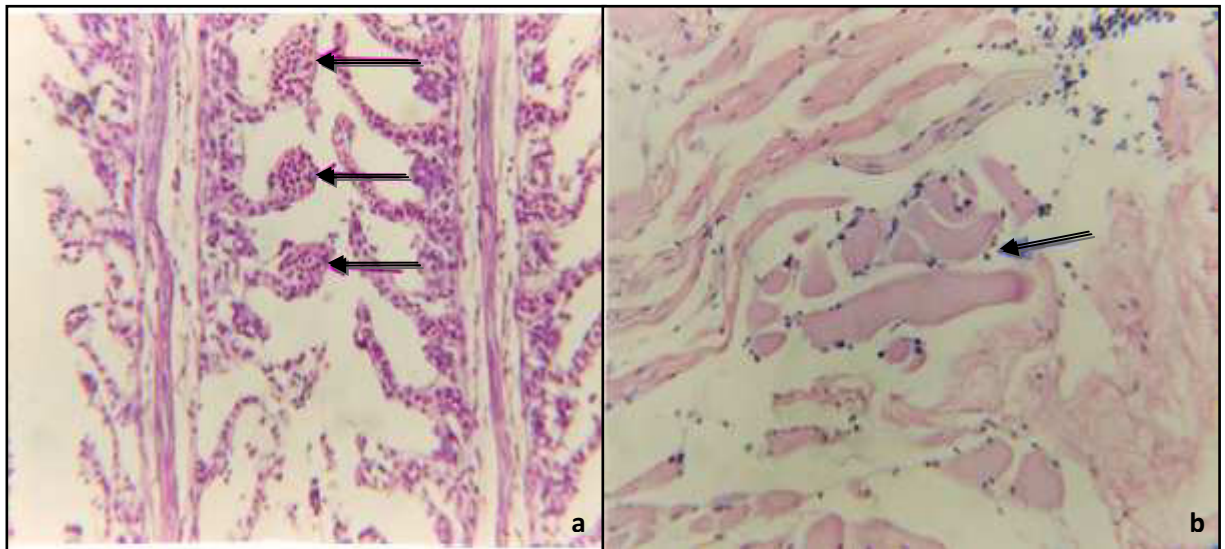


Figura 9. Lesiones por *E. tarda* en a. Branquias; b. Músculo (Galal *et al.*, 2005).

4.4. Diagnóstico

El aislamiento primario de *E. tarda* se logra mejor usando una etapa de enriquecimiento con un caldo de Salmonella-Shigella con doble fuerza o caldo Selenito-Cisteína, seguido por la siembra directa en agar Salmonella-Shigella (Starliper, 2008).

Por otro lado, Horenstein *et al.* (2004) diagnosticaron *E. tarda* usando PCR en muestras de sangre del pez sapo.

Savan *et al.* (2005) reportaron un método sensible y rápido usando LAMP para el diagnóstico de edwardsiellosis.

Actualmente son viables nuevas técnicas para la detección más sensible de *E. tarda*, permitiendo un diagnóstico rápido (Mohanty y Sahoo, 2007). Ootsubo *et al.* (2002) reportaron técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH), usando una sonda oligonucleótida 24-mer (sonda D) que permite la detección de células bacterianas pertenecientes a Enterobacteriaceae, incluyendo *E. tarda*, sin dar ninguna reacción falsa positiva. Otra técnica, la cual identifica, separa y cuantifica bacterias intactas usando electroforesis de alta capilaridad (HPCE), ha sido reportado por Yu *et al.* (2004).

4.5. Tratamiento

Diversos investigadores reportaron el uso de Norfloxacin, ciprofloxacina, oxitetraciclina, gentamicina y cloranfenicol (Sahoo y Mukherjee, 1997), cefazolina (Zhang *et al.*, 2005) y azetronam (Zhu *et al.*, 2006).

4.6. Prevención y Control

Mantener las condiciones medio ambientales adecuadas en los estanques. Los parámetros fisicoquímicos del ambiente deben ser óptimos para prevenir alguna infección. Los criaderos deben mantenerse con sanidad e higiene adecuada, el mejor camino para el control de edwardsiellosis es monitorear constantemente su presencia y mantener la estirpe libre de patógenos (Mohanty y Sahoo, 2007).

El uso de sustancias antiestrés tales como probióticos, ácido ascórbico, lipopolisacáridos pueden ser adicionados al alimento. Pirarat *et al.* (2006) sugirieron que en peces infectados con *E. tarda*, *Lactobacillus rhamnosus* mejoró el sistema de complemento del pez, permitió la agregación de las células fagocíticas, incrementó la actividad fagocítica y subsecuentemente protegió al pez de muerte por septicemia aguda.

Taoka *et al.* (2006) reportaron que la administración de probióticos comerciales conteniendo *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Clostridium butyricum* y *Saccharomyces cerevisiae* mejoraron el sistema inmune no específico, ligeramente mejoraron la supervivencia de tilapia sometida a estrés salino y redujo la mortalidad debido a la infección por *E. tarda*.

Una OMP fue detectada en varios serotipos de *E. tarda*, designada como una vacuna efectiva contra la infección experimental en lenguado japonés (Kawai *et al.*, 2004). Sin embargo, tales vacunas requieren alto costo y trabajo y no son prácticas.

Liu *et al.* (2005) prepararon un GAPDH recombinante de *E. tarda*, la cual puede servir como un antígeno de vacuna, práctico y efectivo contra la infección por *E. tarda* en lenguado japonés. Es interesante notar que el GAPDH de *E. tarda* también protege efectivamente al lenguado de la infección por *Vibrio angillarum*, porque el GAPDH de las dos bacterias patógenas son altamente homólogas (91%) (Liu *et al.*, 2007).

Verjan *et al.* (2005) detectaron siete proteínas antigénicas de *E. tarda* usando antisuero policlonal de conejo y sus secuencias de aminoácidos identificadas como lipoproteínas, proteínas periplásmicas, y proteínas exportadas y secretadas, con roles en el transporte de metabolitos a través de la membrana celular, respuesta al estrés y mortalidad. Los genes detectados y sus productos pueden ser usados para desarrollar vacunas recombinantes o subunidades de ADN.

Por otro lado, se reportan otros importantes métodos de control, tratamiento y prevención de la enfermedad, el uso de inmunoestimulantes. Se seleccionaron un buen número de inmunoestimulantes contra la infección por *E. tarda* en las principales carpas hindúes. Algunos de ellos, tales como β -1,3 glucano de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* en una dosis de 0,1 mg/kg de alimento por 5 veces en intervalo de 3 días se encontraron ser las más efectivas en el tratamiento de la enfermedad y redujeron la mortalidad en *Labeo rohita* en casos agudos (Sahoo y Mukherjee, 2002). Estas sustancias brindan protección contra otros patógenos bacterianos, virales, parásitos y hongos sin crear ningún ambiente nocivo.

V. *Flavobacterium columnare*

5.1. Características microbiológicas

F. columnare es un bacilo gramnegativo, no flagelado, cuya principal característica de motilidad es por medio del deslizamiento o desplazamiento por superficies sólidas. Las características que diferencian esta bacteria de otras son sus habilidades para crecer en presencia de sulfato de neomicina y sulfato de polimixina B, la producción de colonias rizoides con pigmentación amarillenta, la producción de una enzima que degrada la gelatina y condroitin sulfato B y la absorción de rojo congo dentro de sus colonias (Sebastião *et al.*, 2011).

5.2. Epidemiología

F. columnare es considerado un patógeno oportunista y forma parte de la microbiota normal en agua y suelo, en la piel, intestino y branquias de los peces (Sebastião *et al.*, 2011). Sin embargo, bajo condiciones desfavorables tales como temperaturas mayores a 20° C, reducidos niveles de oxígeno disuelto, elevadas concentraciones de amonio, elevada densidad poblacional, contaminación con otras bacterias, ambientes eutróficos o daños causados a la superficie corporal del pez, la bacteria es capaz de invadir el huésped y desencadenar enfermedades epizoóticas (Sebastião *et al.*, 2011).

5.3. Patogenia

5.3.1. Ruta de ingreso

Columnaris es una enfermedad contagiosa que puede ser transmitida horizontalmente a través del contacto directo y heridas en la piel así como a través de la ruta oro fecal (Mohamed y Ahmed, 2011).

5.3.2. Factores de virulencia

Los mecanismos de virulencia de *F. columnare* son pobremente conocidos. Se ha sugerido que la adhesión sobre el tejido de las branquias es un paso importante en la patogénesis de esta bacteria, y que la quimiotaxis a la mucosa de los peces está asociada con la virulencia del patógeno (Kunttu, 2010).

Adicionalmente, la actividad de las enzimas degradantes del tejido conectivo, condroitin liasa AC, ha mostrado estar relacionada con la virulencia de *F. columnare*. También se ha detectado que la composición del LPS de cepas virulentas difiere de los mutantes no virulentos (Kunttu, 2010).

5.3.3. Signos clínicos

La enfermedad se caracteriza clínicamente por la presencia de áreas de erosión o lesiones necróticas poco profundas, de color blanquecino-grisáceo a blanquecino-amarillento, localizadas a nivel de las aletas (“podredumbre de las aletas”), cabeza y/o cuerpo. Las branquias también son afectadas y muestran signos de palidez y necrosis. Epizootias de la columnaris son especialmente importantes cuando la temperatura del agua es de 21° C o más, dando lugar a elevadas pérdidas en los peces afectados. Los alevines en proceso de reversión sexual son los más afectados por esta enfermedad (Sandoval *et al.*, 2010).

Mohamed y Ahmed (2011) infectaron a *Tilapia nilotica* con 0.2×10^8 UFC de *F. columnare*, observando pérdida de apetito y distrés respiratorio, los peces nadaron cerca de la superficie del agua, respirando y envolviendo el aire atmosférico. Además mostraron rápidos movimientos del opérculo con manifestación nerviosa y se reportó 70% de mortalidad.

Las lesiones en la piel fueron amplias erosiones con pérdida de escamas y placas rojo-grisáceas, particularmente en la región frontal de la cabeza y abdomen. Úlceras pequeñas hemorrágicas rodeadas por una zona erosionada roja fue visualizada sobre las áreas pélvica y anal. Se observó hemorragia en la base de las aletas pectorales, además de la aleta caudal fragmentada con edema y un margen gris descolorido. Se observó necrosis de la porción membranosa de la aleta caudal, los filamentos de las branquias congestionados, inflamados y cubiertos con moco profuso. Los órganos viscerales (hígado, bazo y riñón) estuvieron congestionados. En algunos casos, se encontró opacidad corneal (Mohamed y Ahmed, 2011).

5.3.4. Lesiones

Mohamed y Ahmed (2011) reportaron las lesiones encontradas en tilapias desafiadas con *F. columnare*, las más significantes fueron restringidas a la piel y las branquias, además de las lesiones septicémicas en otros órganos.

La piel mostró necrosis coagulativa y severa espongiosis en la epidermis. En algunos casos, la necrosis epidermal y las pústulas, indujeron erosiones o ulceraciones; las cuáles mostraron masas de colonias bacterianas basofílicas (Mohamed y Ahmed, 2011).

Las ulceraciones penetraron a los tejidos más profundos, produciendo dermatitis necrótica, miositis y perimiositis (Mohamed y Ahmed, 2011) (Fig. 10).

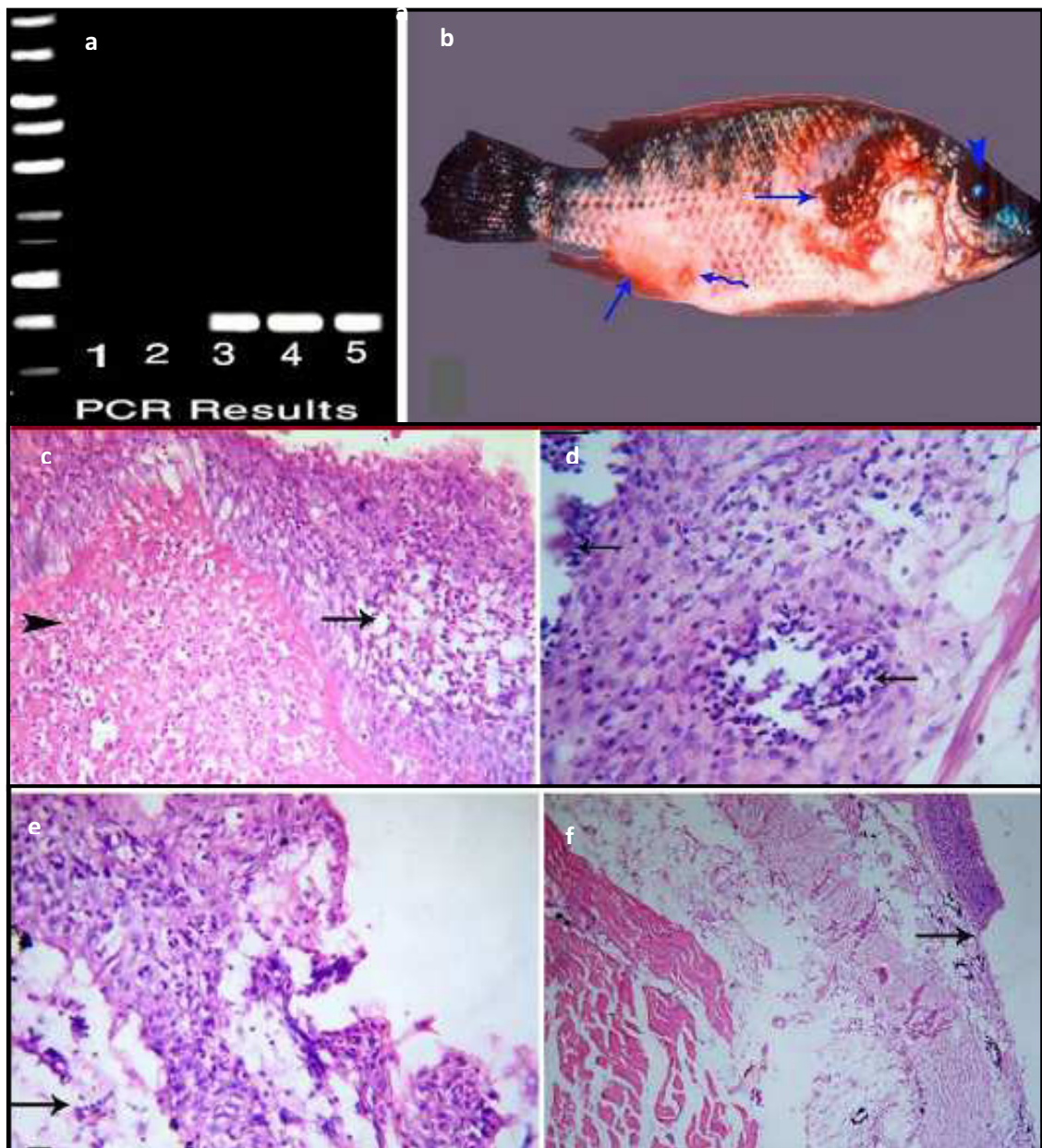


Figura 10. a. Resultados PCR; b. Tilapia mostrando erosiones en la piel, úlceras y manchas hemorrágicas grisáceas; c. Piel mostrando necrosis coagulativa en la epidermis; d. Piel mostrando pústulas; e. Piel mostrando degeneración hidrópica y espongiosis con edema dermal; f. Piel mostrando ulceración de la epidermis (Mohamed y Ahmed, 2011).

La infección de las branquias son las menos comunes, pero son las más serias, las lesiones comienzan en la punta de la laminilla y causa una necrosis progresiva que se extiende a la base del arco de las branquias, donde se encuentran las lesiones más severas, representadas por degeneración balonante, espongiosis, degeneración hidrofóbica y necrosis, además de hipertrofia e hiperplasia de las células mucosas. También se presentó edema, congestión,

hemorragias e infiltración leucocítica, principalmente con neutrófilos y linfocitos (Mohamed y Ahmed, 2011) (Fig. 11).

El hígado mostró necrosis coagulativa e infiltración de neutrófilos, congestión de los vasos sanguíneos. Se observó reemplazo del parénquima hepático con tejido conectivo fibroso, infiltrado con numerosos macrófagos, linfocitos y células polimorfonucleares (Mohamed y Ahmed, 2011) (Fig. 11).

El riñón reveló áreas multifocales de necrosis coagulativa y hemorragias, con moderada degeneración hidrofóbica en el revestimiento epitelial de los túbulos renales y encogimiento de los glomérulos. Asimismo, se observó áreas focales de fibrosis y células mononucleares, que reemplazaron el tejido renal (Mohamed y Ahmed, 2011).

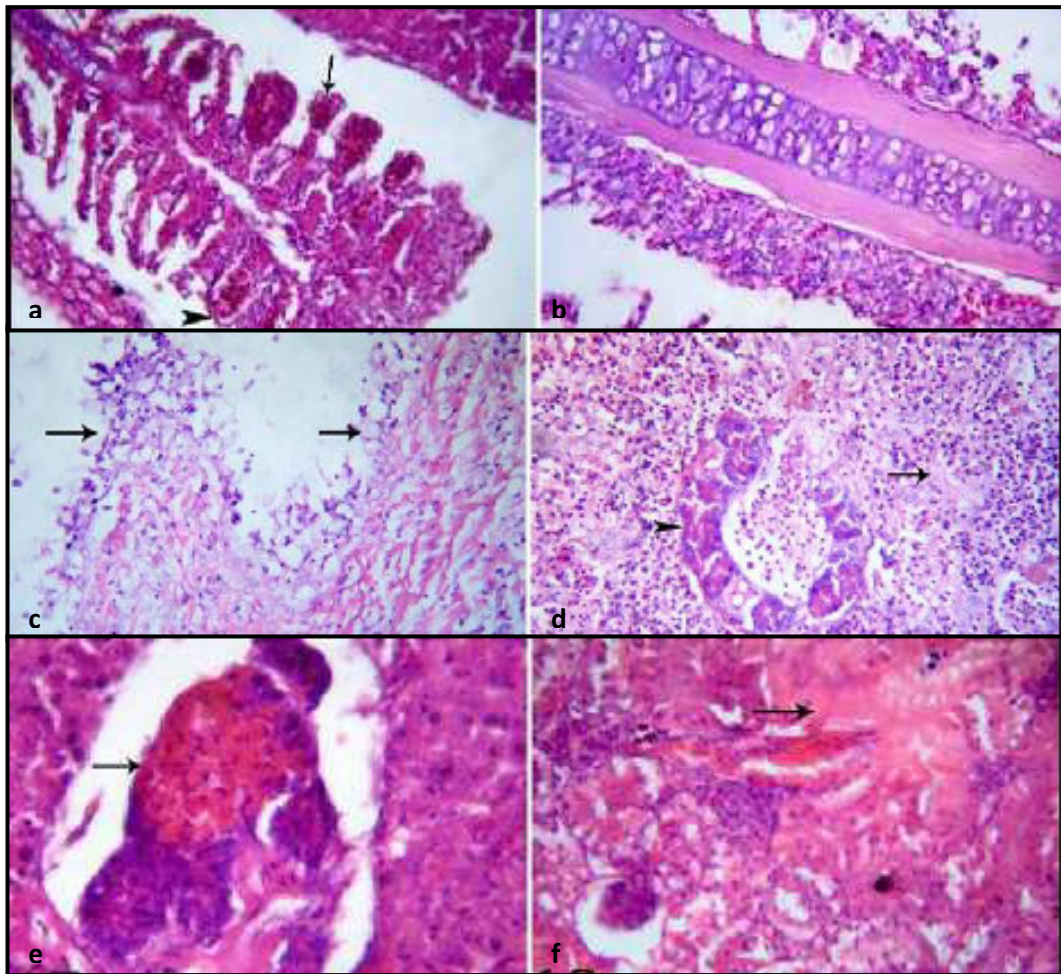


Figura 11. a. Branquias mostrando congestión de los capilares sanguíneos laminares y aneurismas focales; b. Branquias mostrando espacios interlaminares obliterados por hiperplasia de células mucosas y epiteliales con infiltración de neutrófilos; c. Arco branquial mostrando degeneración balonante multifocal, espongiosis, degeneración hidrópica y necrosis; d. Hígado mostrando necrosis coagulativa e infiltración de neutrófilos; e. Acino pancreático mostrando atrofia y necrosis coagulativa; f. Riñón mostrando necrosis coagulativa en epitelio tubular. (Mohamed y Ahmed, 2011).

5.4. Diagnóstico

La detección de *F. columnare* por métodos moleculares modernos; tales como PCR basado en técnicas empleando primers especie – específicos (Darwish *et al.*, 2004) y por análisis de secuencia de ADN (Zhang y Arias, 2009).

5.5. Tratamiento

Mohamed y Ahmed (2011) reportaron el uso de oxitetraciclina en tilapias para tratar la enfermedad, encontrando que minimiza las lesiones por *F. columnare*.

El aceite de la cebolla china *Allium tuberosum* fue estudiado por su contenido de sulfuro de dialil y su actividad antimicrobiana frente a *F. columnare* tanto *in vitro* como *in vivo*. Se encontró que el aceite tiene una concentración muy baja de monosulfuro dialil en relación con los sulfuros de otros dialil (dialil disulfuro, dialiltrisulfuro y tetrasulfuro dialil) identificados. En el estudio *in vitro*, el aceite de cebolla china tuvo un efecto bactericida en todas las cepas probadas de *F. columnare*, con diversas concentraciones inhibitorias mínimas. En el estudio *in vivo*, no se observó mortalidad en la dieta de los peces suplementada con 800 mg / kg de aceite de cebolla china y 100 mg / kg de clorhidrato de oxitetraciclina 5 días antes de la infección con la cepa *F. columnare* 4 a la DL₅₀. Estos resultados indicaron que el aceite de cebolla china tiene el potencial para reemplazar a los antibióticos para el control de enfermedades de peces causadas por *F. columnare* (Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2009) .

5.6. Prevención y Control

Las medidas de prevención y control de la columnaris incluyen mantenimiento de la calidad del agua, densidad poblacional indicada para la especie bajo cultivo y la correcta alimentación de los peces. El uso de nifurpirinol (NFP) y otros nitrofuranos han sido muy exitosos en el tratamiento existiendo otros antibióticos que pueden ser utilizados (Sandoval *et al.*, 2010).

El uso de probióticos, como *Bacillus subtilis* incluido en la dieta y en el agua de tilapias, dos meses antes del desafío con *F. columnare*, favoreció la no presentación de signos clínicos, además no se reportó mortalidad (Mohamed y Ahmed, 2011).

VI. *Vibrio vulnificus*

6.1. Características microbiológicas

V. vulnificus pertenece a la familia Vibrionaceae, son bacilos gramnegativos, halofílicos, rectos y curvos, móviles por la presencia de un flagelo polar, oxidasa positivos, no esporulados. Son termolábiles y se comportan como anaerobios facultativos (Dávalos *et al.*, 2005).

6.2. Epidemiología

Las cepas de *V. vulnificus* son clasificadas dentro de biotipos, basadas sobre sus características bioquímicas. Las cepas pertenecientes al biotipo 1 son responsables de la mayoría de infecciones humanas, mientras las cepas del biotipo 2 son patógenos primarios de anguilas. Se ha identificado un tercer biotipo (biotipo 3) que posee propiedades bioquímicas de ambos biotipos y causa infecciones de heridas en humanos (Jones y Oliver, 2009) y ha sido restringido a personas que manipulan peces vivos, principalmente *Tilapia* spp., reportado en Israel (Bisharat *et al.*, 1999)

La vibriosis es una de las enfermedades enzoóticas más prevalentes en peces de todo el mundo; incluyendo especies marinas, salobres y ocasionalmente peces de agua dulce (El-Seedy *et al.*, 2009). Se ha considerado a *Vibrio vulnificus* como un organismo patógeno de alto riesgo para los peces (Mahmud *et al.*, 2010).

V. vulnificus habita la columna de agua, sedimentos, plancton y organismos mayores tales como moluscos, crustáceos y peces (Hutchison, 2010).

6.3. Patogenia

6.3.1. Ruta de ingreso

Se ha postulado que las puertas de entrada para especies de *Vibrio* en peces son el tracto gastrointestinal (Horne y Baxendale, 1983; Kanno *et al.*, 1989; Olsson *et al.*, 1996), branquias (Baudin-Laurencin y German, 1987) y piel (Grimes *et al.*, 1985; Kanno *et al.*, 1989).

6.3.2. Factores de virulencia

La virulencia de *V. vulnificus* es multifactorial. Este microorganismo tiene la capacidad de adherirse a las células epiteliales (Reyes *et al.*, 1987), el pili en *V. vulnificus* patogénico ha sido identificado como pili tipo IV, Grupo A (Paranjpye *et al.*, 1998).

Produce, además ECPs, que son enzimas que dañan la permeabilidad vascular como la elastinasa, lecitinasa, fosfolipasas, mucinasa, proteasas, elastasa (Garcia y Landgraf, 1998), metaloproteasa (Gulig *et al.*, 2005), condroitina sulfatasa, (Oliver *et al.*, 1986).

Una variedad de cápsulas polisacárido extracelular son producidas por *V. vulnificus* y están correlacionadas positivamente con cepas virulentas (Wright *et al.*, 1990, Yoshida *et al.*, 1985). CPS provee protección contra la respuesta inmune del huésped (Harris-Young *et al.*, 1983; Yoshida *et al.*, 1985) así como la producción de citoquinas pro inflamatorias (Hutchison, 2010).

6.3.3. Signos clínicos

El-Seedy *et al.* (2009) realizaron un estudio experimental e inyectaron ECPs crudos de *V. vulnificus* (1,6 mg proteína/ml) a diez especies de *O. niloticus*, causándoles la muerte al segundo día post inoculación. Los principales signos clínicos observados fueron coloración oscura con hemorragias por todo el cuerpo de los peces, especialmente sobre la superficie dorsal, la base de las aletas y alrededor del opérculo, además de úlceras en la piel las cuales se extendieron dentro de la musculatura. Los hallazgos post mortem revelaron hemorragias severas y congestión en intestino, hígado, riñones y bazo. La mortalidad acumulativa fue de 80%. Estos resultados fueron coincidentes con los reportados por Fouz *et al.* (2002), quienes notificaron áreas hemorrágicas extensivas sobre la superficie corporal de *O. niloticus* moribundo especialmente sobre la boca, branquias y base de las aletas después de la inyección IP de ECPs de *V. vulnificus*.

6.3.4. Lesiones

Los hallazgos post mortem revelaron hemorragias severas y congestión en intestino, hígado, riñones y bazo. La mortalidad acumulativa fue de 80%. Estos resultados fueron coincidentes con los reportados por Fouz *et al.* (2002), quienes notificaron áreas hemorrágicas extensivas sobre la superficie corporal de *O. niloticus* moribundo especialmente sobre la boca, branquias y base de las aletas después de la inyección IP de ECPs de *V. vulnificus* (El-Seedy *et al.*, 2009).

6.3.5. Diagnóstico

La identificación serológica requiere preparación de anticuerpos ya que no hay anticuerpos comerciales específicos para *V. vulnificus*. La hibridización de las colonias con una sonda de oligonucleótidos específico para *V. vulnificus* es rápida y rentable. Asimismo, la identificación de *V. vulnificus* con sondas de oligonucleótidos o primers de ADN dirigidos contra la secuencia rARN es recomendado (Hoi *et al.*, 1999).

6.4. Tratamiento

Actualmente las cepas aisladas de *V. vulnificus* de Israel son sensibles a todos los antibióticos usados en el test de disco estándar de susceptibilidad, excepto por la resistencia esporádica a gentamicina. El uso de tetraciclina en el tratamiento de infecciones por *V. vulnificus* está basado sobre un modelo de ratón donde demostró ser altamente eficaz (Bisharat, 2002).

6.5. Prevención y Control

El-Seedy *et al.* (2009) reportaron una marcada reducción en la mortalidad de *O. niloticus* cuando inyectaron levamisol a una dosis de 0,5 mg/kg de peso vivo en combinación con una inyección IP de ECPs de *V. vulnificus* o *Legionella anguillarum*; desde 90 a 40 y de 80 a 30%, respectivamente. Estos datos arrojan a la luz los efectos benéficos de levamisol como inmunomodulador.

Se ha desarrollado una vacuna contra *V. vulnificus*, sin embargo, no ha sido evaluada más allá de estudios pre clínicos en ratones. La vacuna antisuero es producida contra la cápsula de *V. vulnificus* y la protección brindada es específico del tipo de cápsula (Bisharat, 2002).

Por otro lado, las ánguilas responden a la infección con *V. vulnificus* y a la vacunación por inyección y baño, desarrollando una protección en mucosas y sistémica, basada en anticuerpos, así como una cierta memoria inmunológica. El patrón de respuesta es muy

repetitivo. Tras la vacunación (mediante inmersión prolongada en tres dosis), los animales empiezan produciendo anticuerpos de mucosa en branquias, con un máximo de tres días, y en piel e intestino, con un máximo a los cinco días, momento en que comienzan a elevarse los anticuerpos en la sangre de forma significativa, alcanzándose un máximo a los siete días y manteniéndose los niveles significativamente superiores a los controles no vacunados durante más de un mes (Amaro, 2010).

VII. *Francisella asiatica* (syn. *F. noatunensis* subsp *orientalis*)

7.1. Características microbiológicas

Es un cocobacilo pequeño gramnegativo, pleomórfico, no móvil, estrictamente aeróbico, intracelular facultativo, que no produce esporas (Foley y Nieto, 2009).

F. asiatica es catalasa e indol positivo, oxidasa negativo, no produce H₂S en agar Hierro azúcar triple, y no hidroliza la gelatina; además produce ácido D-glucosa, maltosa, sucrosa (débil), pero no lactosa ni glicerol. Las bacterias aisladas crecen sobre agar Mac Conkey y agar nutritivo (6% NaCl) (Ottem *et al.*, 2007).

7.2. Epidemiología

F. asiatica ha sido descrita recientemente como miembro del género *Francisella* (Mikalsen *et al.*, 2007; Mikalsen y Colquhoun, 2009). Fue recuperada de tres *Parapristipoma trilineatum* enfermos en Japón y ese aislamiento fue usado para describir la nueva especie (Kamaishi *et al.*, 2005; Mikalsen y Colquhoun, 2009).

En los últimos cinco años la bacteria ha causado mortalidad substancial en tilapia (*Oreochromis* spp.) y otras especies importantes de aguas calientes y frías cultivadas en los Estados Unidos (incluyendo Hawai), Taiwan, América Latina (particularmente Costa Rica), y Japón (Kamaishi *et al.*, 2005; Hsieh *et al.*, 2006; Kay *et al.*, 2006; Ostland *et al.*, 2006; Mikalsen y Colquhoun, 2009; Soto *et al.*, 2009; Vojtech *et al.*, 2009).

La infección y transmisión de *F. asiatica* al parecer está restringida a una temperatura entre 20° C – 28° C en robalo rayado (Ostland *et al.*, 2006). Por otro lado, en tilapias se observó una mayor mortalidad a 15° C que a 30° C (Chern y Chao, 1994).

7.3. Patogenia

El éxito de *Francisella* como un agente patógeno está íntimamente asociado con su habilidad para sobrevivir y replicarse dentro de una amplia variedad de tipos de células huésped (Pechous *et al.*, 2009).

Francisella ingresa a las células a través del proceso de fagocitosis (looping fagocitosis), que involucra el reordenamiento de la actina a través de la señalización de fosfatidilinositol 3-quinasa y es dependiente de la presencia de factor C3 y el receptor CR3 del complemento (Clemens *et al.*, 2005 y 2007). Seguido de la internalización dentro de la célula, *Francisella* es capaz de alterar los procesos bactericidas normales, esto previene la inducción del estallido respiratorio (Fortier *et al.*, 1994).

El organismo inicialmente reside en compartimento unido a la membrana que adquiere limitadas cantidades de marcadores endosomales prematuros y marcadores endosomal-lisosomal tardíos, incluyendo EE1, CD63, LAMP1 y LAMP2 (Clemens *et al.*, 2009). Las vacuolas conteniendo *F. tularensis* fallan para adquirir la catepsina D hidrolasa y no se fusionan con los lisosomas (Clemens *et al.*, 2009). Adicionalmente, *F. tularensis* altera la célula huésped, escapa del fagosoma y entra la citosol, donde se somete a una replicación extensa (Pechous *et al.*, 2009) (Fig. 12).

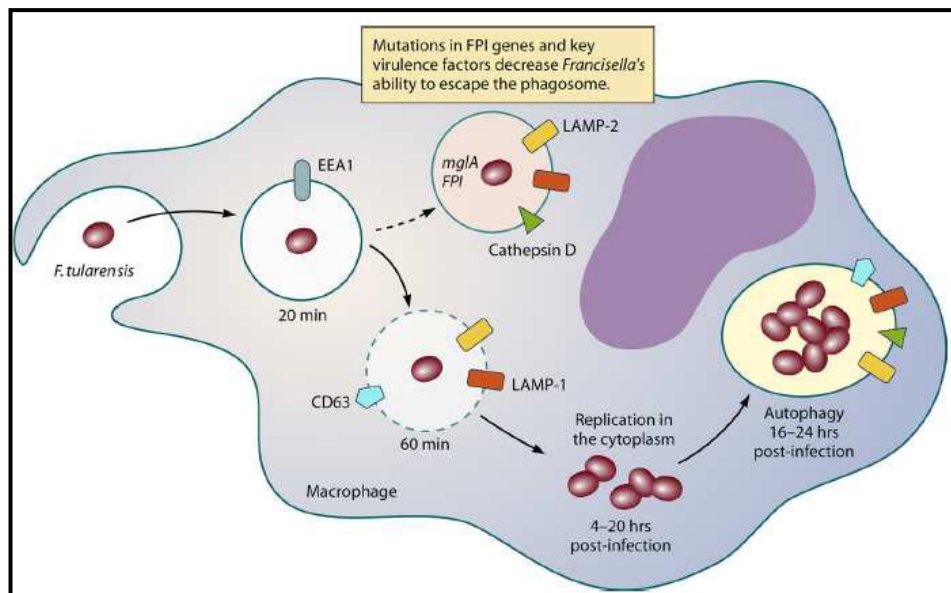


Figura 12. Ilustración de la supervivencia de *Francisella* dentro de los macrófagos (Pechous *et al.*, 2009)

7.3.1. Ruta de ingreso

Los miembros del género *Francisella*, al ser organismos no móviles, son transmitidos por contacto directo con animales infectados, a través del agua o alimento contaminado, o por vectores tales como insectos picadores (Colquhoun y Duodu, 2011).

La transmisión de francisellosis en peces tiene una conexión con el ambiente acuático, y la enfermedad ha sido identificada en peces de agua dulce y salada (Fukuda *et al.*, 2002; Kamaishi *et al.*, 2005; Olsen *et al.*, 2006; Birkbeck *et al.*, 2007; Mikalsen *et al.*, 2007).

Al parecer la francisellosis es altamente transmisible bajo óptimas condiciones ambientales, como la prevalencia de la infección dentro de cultivos de bacalao atlántico y tilapia puede ser extremadamente alta (Olsen *et al.*, 2006; Chern y Chao, 1994). Por otro lado, Colquhoun y Duodu, 2011 reportaron que el contacto pez a pez es innecesario, ya que el bacalao puede ser directamente infectado vía efluente del agua de tanques conteniendo peces infectados.

Además se reportó que *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* puede ser cultivada del intestino del 50% de cohabitantes del bacalao atlántico (Mikalsen *et al.*, 2009), lo cual puede indicar que la ruta fecal-oral es una fuente importante de transmisión (Colquhoun y Duodu, 2011). Asimismo, la identificación de *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* en huevos de bacalao atlántico podría indicar que la enfermedad, puede ser transmitida verticalmente; sin embargo, es necesario mayor investigación (Colquhoun y Duodu, 2011).

7.3.2. Factores de virulencia

La isla de patogenicidad de *Francisella* (IPF), es un locus de 30 kb identificado dentro del genoma de *F. tularensis*. Las funciones asociadas a los genes codificados por la IFP incluyen crecimiento intracelular y escape del fagosoma (Soto, 2010a) (Figura 13).

Varios genes homólogos a *iglA*, *iglB*, *iglC* e *iglD* de *F. tularensis* han sido encontrados en la cepa LADL 07-285 A de *F. asiatica*, aislada de tilapias enfermas (Soto, 2010a).

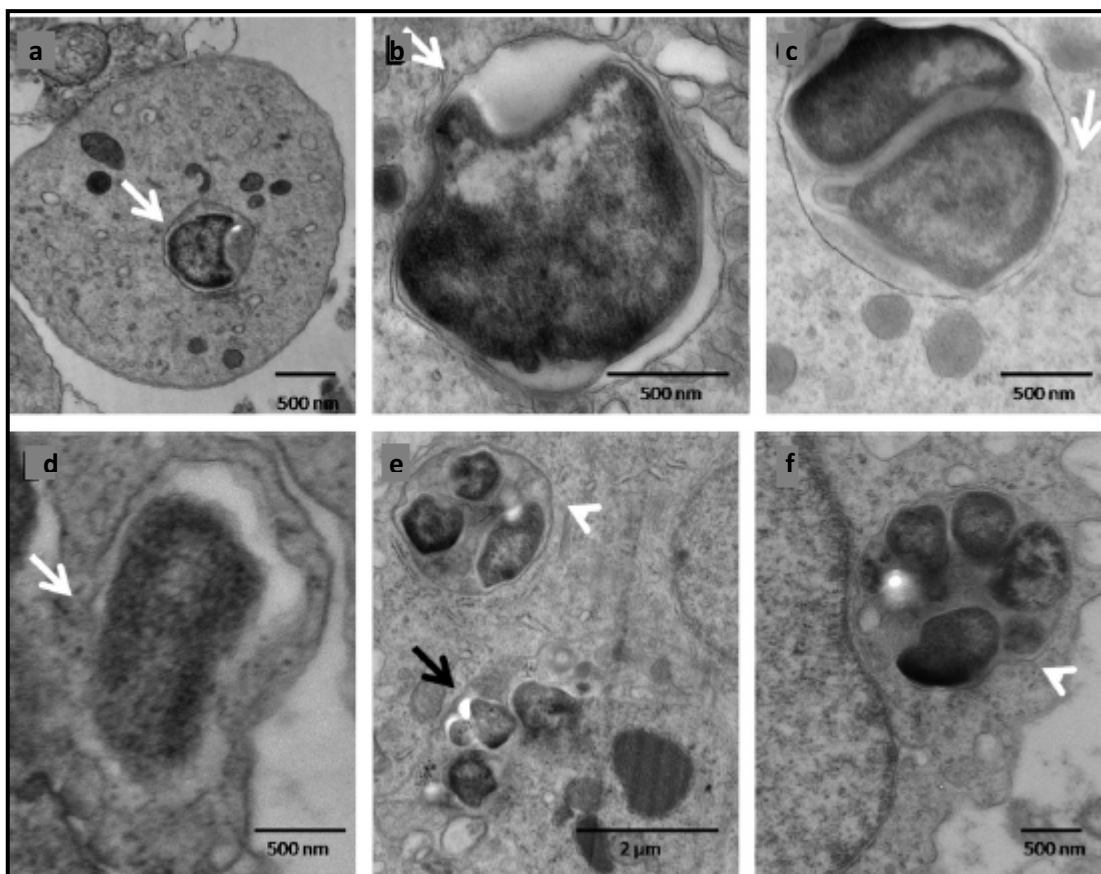


Figura. 13. Transmisión electrónica de barrido de THKDM de tilapias infectadas con *F. asiatica* LADL 07-285 A; (a y b). Después de la absorción, las bacterias son localizadas al interior de la vacuola fagocítica estrechamente unida a la membrana (flecha blanca) dentro del macrófago; (c y d). El desglose de la membrana fagosomal (flechas) parece permitir a *F. asiatica* acceder al citoplasma en 6 a 12 h. post infección; (e y f). Después de 12 h., varias bacterias son encontradas dentro de vacuolas amplias (puntas de flecha), y algunas parecen haber escapado del citoplasma (flecha) (Soto *et al.*, 2010a).

7.3.3. Signos clínicos

Los peces infectados mostraron signos clínicos no específicos, tales como nado errático, anemia, anorexia, exoftalmia y alta mortalidad (Soto *et al.*, 2009; Soto *et al.*, 2010).

Los signos clínicos, cambios patológicos graves, y hallazgos histopatológicos descritos en las tilapias afectadas en Costa Rica, concuerdan con los reportes previos de Hsieh *et al* (2006) y Mauel *et al.* (2007), en tilapias cultivadas. Los signos clínicos predominantes fueron la alta mortalidad presente en los alevines. De acuerdo a los criadores, los peces afectados nadaron erráticamente por cinco a diez minutos y, luego sucumbieron y murieron. Este signo clínico puede estar relacionado con la cantidad de infiltración celular inflamatoria

granulomatosa presente en el sistema nervioso central, ya que los peces más afectados son aquellos que mostraron este comportamiento (Soto *et al.*, 2010).

Soto *et al* (2009) demostraron que tan solo 23 bacterias de *F. asiática* inyectadas en el peritoneo son capaces de causar mortalidades en tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*), y que aún menos son suficientes para causar lesiones patológicas serias en órganos importantes como el riñón y el bazo. (Fig. 14).

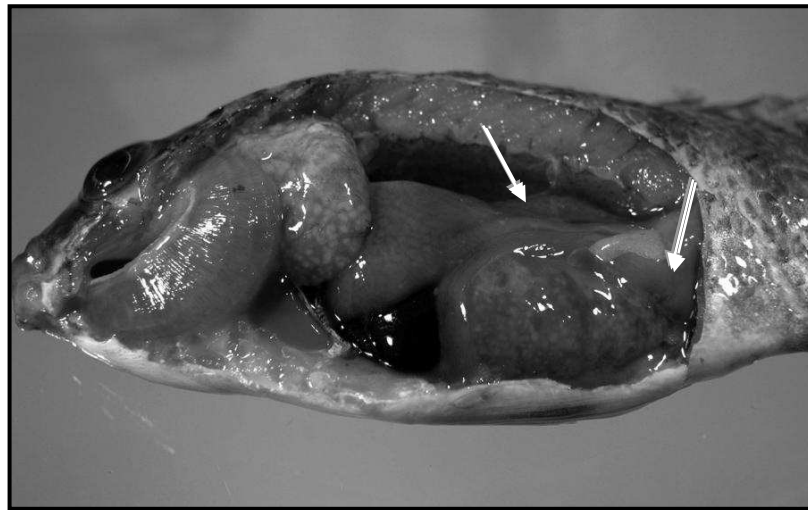


Figura 14. Esplenomegalia y renomegalia con extensos nódulos blancos multifocales en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Soto, 2009).

7.3.3. Lesiones

Histopatológicamente, los cambios más severos involucraron las branquias, bazo, y riñones, sin embargo cambios patológicos también estuvieron presentes en el hígado, corazón, ojos, sistema nervioso central, y tracto gastrointestinal. Inflamación granulomatosa estuvo presente en casi todos los órganos, con gran número de macrófagos conteniendo cocobacilos pleomórficos (Soto *et al.*, 2009).

Adicionalmente a la respuesta granulomatosa, las branquias mostraron fusión de las laminillas primarias y secundarias debido a la hiperplasia epitelial. En casos severos, una infiltración celular y la presencia de granulomas fueron observadas en pericardio y miocardio. La formación del granuloma no fue observada en el cerebro; en su lugar se encontró una masiva infiltración de macrófagos en los peces afectados severamente. Cuando se usó la coloración Giemsa, la presencia de cocobacilos pleomórficos fue visible dentro y fuera de las células (Soto *et al.*, 2009) (Fig. 15).

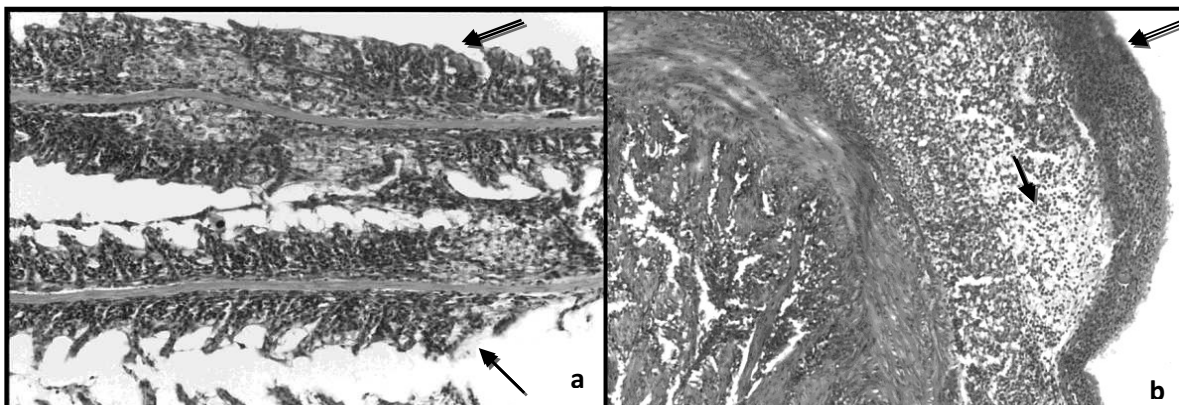


Figura 15. Hallazgos histopatológicos de Francisellosis en tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). a. Hiperplasia e hipertrofia primaria y secundaria de las laminillas de las branquias; b. Pericarditis con infiltrado celular granulomatoso (Soto *et al.*, 2009).

Análisis histológicos señalan que una mínima dosis infectiva de *F. asiatica* (23 UFC/ml) de un tanque de agua fue capaz de causar lesiones histopatológicas significantes en el bazo y la región cefálica del riñón (Soto, 2010) (Fig. 16).

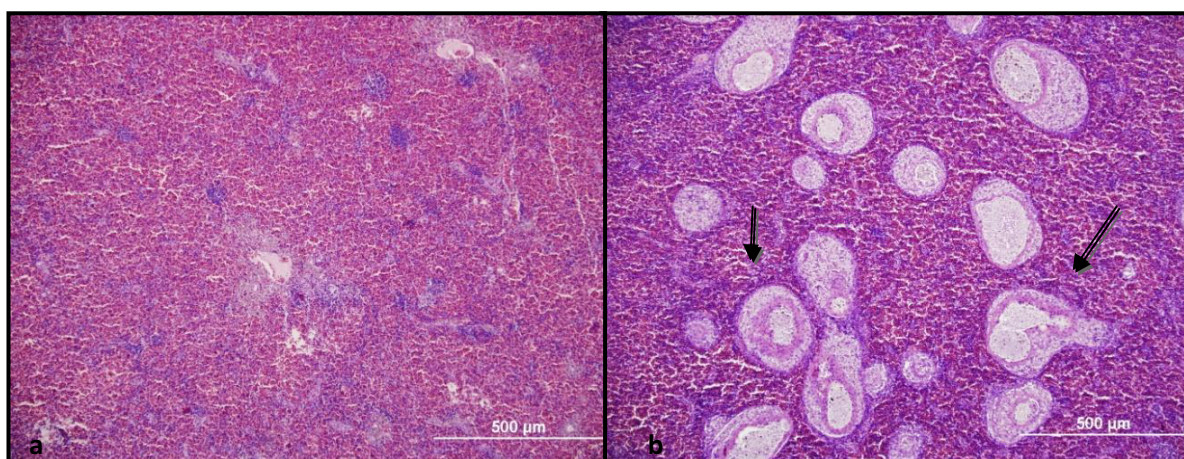


Figura 16. Microfotografía histológica de un bazo no infectado y un bazo infectado de tilapia 40 días post infección. a. Parénquima esplénico normal y estroma de un bazo de tilapia no infectado; b. Bazo severamente infectado presentando extensas lesiones granulomatosas con una mezcla de infiltrado inflamatorio. (Soto, 2010).

7.4. Diagnóstico

La prueba confirmatoria para el diagnóstico de francisellosis, es el cultivo de la bacteria en combinación con las observaciones histológicas y macroscópicas consistentes con la enfermedad.

Se han usado diversos tipos de medios de cultivo para el aislamiento primario de *Francisella* spp. en peces; todos incluyen niveles elevados de cisteína y glucosa (Colquhoun y Duodu, 2011).

Por otro lado, para confirmar la francisellosis se ha empleado PCR asociado con primers universales, dirigidos al gen bacteriano 16S ARNr, seguido de la amplificación y secuenciación del ADN (Colquhoun y Duodu, 2011).

7.5. Tratamiento

Chern y Chao (1994) consideraron el uso de oxitetraciclina, por unos 10 a 14 días de tratamiento con 30 – 50 mg/kg, como un probable tratamiento efectivo para francisellosis en tilapia, mientras Mauel *et al.* (2005) y Ostland *et al.* (2006) también reportaron un tratamiento exitoso con tetraciclina en tilapia y lobina rayada híbrida, respectivamente.

Para *F. noatunensis*, pruebas *in vitro* indicaron que la cepa GM2212T fue resistente a trimetoprim – sulfametoxazol, penicilina, ampicilina, cefuroxima y eritromicina; sin embargo, fue susceptible a ceftazidime, tetraciclina, gentamicina y ciprofloxacina (Ottem *et al.*, 2007).

Soto *et al.* (2010b) evaluaron la eficacia del florfenicol en tilapias que recibieron alimento medicado con 15 mg/kg de peso corporal. Feng *et al.* (2008) reportaron que, en menos de 24 horas después de una sola dosis oral de florfenicol, las tilapias de agua dulce presentaron concentraciones del antibiótico 5.21 µg/g, 5.27 µg/g, 4.59 µg/g, y 5.50 µg/g en hígado, branquias, músculo, y riñón; respectivamente.

Estos estudios han concluido que el florfenicol administrado en alimento medicado iniciado el día uno post infección y alimentados diariamente por diez días, redujeron significativamente la mortalidad en tilapias infectadas experimentalmente con *F. asiatica* y previno la diseminación de la bacteria a órganos hematopoyéticos. No ocurrieron cambios patológicos, y un número reducido de bacterias se mantuvo en el bazo hasta 30 días post desafío. Por el contrario, la administración de alimento medicado durante 10 días a partir del día 3 a 6 después de la infección llevó al desarrollo de una infección crónica y no letal, sugiriendo que *F. asiática* puede tener una inclinación hacia la latencia. De esta manera, la infección puede ser contenida o eliminada si hay un tratamiento antibiótico temprano (< 6 días post infección), previniendo que la carga bacteriana llegue a un nivel letal para el huésped (Soto *et al.*, 2010b).

7.6. Prevención y Control

Soto *et al.* (2010a) caracterizaron una cepa atenuada de *F. asiatica* (\DeltaiglC) como una potencial vacuna viva atenuada, la administración vía inmersión tiene la ventaja de dirigirse directamente a las rutas naturales de unión y penetración de la bacteria dentro del pez y, por lo tanto, inducir una inmunidad protectora en el sitio primario de la infección.

Los resultados sobre estudios de inmunización indicaron que cuando la vacuna mutante \DeltaiglC fue distribuida de 30 a 180 minutos con una dosis de 10^7 UFC/ml, los valores del porcentaje de supervivencia relativa (RSP) fueron 68.75% y 87,5%, respectivamente, demostrando el potencial de la vacuna para prevenir la francisellosis en tilapia (Soto *et al.*, 2010a).

Los resultados mostraron que una vacunación por inmersión con un mutante \DeltaiglC , protege significativamente los alevines de tilapia contra el desafío por inmersión de homólogos de *F. asiatica*. Nuestros resultados mostraron que \DeltaiglC estimuló una respuesta humoral sistémica, demostrado por los altos títulos de anticuerpos encontrados en suero y mucosa de la piel de peces vacunados (Soto *et al.*, 2010).

Los estudios de inmunidad pasiva demostraron que los anticuerpos específicos contra *F. asiatica*, mediaron la protección después de la inyección IP a diferentes concentraciones de *F. asiatica* WT. Estos investigadores piensan que la respuesta de anticuerpos específicos contra *F. asiatica* es un componente usual de la respuesta inmune protectora a la infección letal en peces (Soto *et al.*, 2010a).

Además, *F. asiatica* siendo un organismo intracelular facultativo, también puede existir en forma extracelular, así se considera que los anticuerpos son capaces de prevenir la diseminación sistémica de la bacteria, pues la respuesta de la mucosa observada en este estudio demostró que la vacunación de peces previene cantidades altas de anticuerpos anti *F. asiatica* en 6, 8 y 10 semanas post vacunación, de esto se puede especular que los anticuerpos de la mucosa pueden servir para inhibir el daño o posible colonización bacteriana externa en los tejidos de los peces (Soto *et al.*, 2010a).

VIII. *Streptococcus* spp.

Actualmente, la estreptococosis es una de las infecciones bacterianas más importantes que afectan a la tilapia y ha evolucionado de una “patología emergente” a una entidad verdadera, completamente identificada y bien establecida. Esta enfermedad se ha reportado en todo el mundo, afectando a más de 45 especies de peces en ambientes de agua dulce, agua de mar y estuarios en África, América, Asia, Australasia y Europa. En nuestro continente se han reportado casos de estreptococosis en tilapia cultivada cuando menos en 12 países de Norte, Centro y Sudamérica, y en el Caribe (Conroy, 2009).

Los aislamientos de *Streptococcus* spp. procedentes de tilapias enfermas en el continente americano se han identificado como *S. agalactiae* y *S. iniae*, aun cuando se han reportado algunas otras especies como *S. constellatus* y *Streptococcus* spp. (Evans *et al.*, 2006a; Conroy, 2007; Klesius *et al.*, 2008; datos no publicados) (cuadro 1).

Cuadro 1. Algunos casos de estreptococosis reportados en tilapia de agua dulce cultivada en el continente americano, con sus correspondientes agentes etiológicos

Tilapia	País	<i>S. iniae</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. constellatus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.
<i>O. niloticus</i>	Brasil	-	+	-	-
	Canadá	+	-	-	-
	Ecuador	-	+	-	-
	El Salvador	-	-	-	-
	EEUU	+	+	-	-
	Honduras	+	+	-	-
	Perú	+	-	-	-
	Venezuela	+	-	-	-
<i>O. aureus</i>	EEUU	+	-	-	-
<i>O. niloticus</i>					
<i>O. aureus</i>	EEUU	+	-	-	-
<i>O. mossambicus</i>					
<i>O. urolepis hornorum</i>					
<i>O. niloticus</i>					
<i>O. aureus</i>	Venezuela	+	-	-	-
<i>Oreochromis</i> spp.	Canadá	+	-	-	-
	Colombia	+	+	-	-
	ecuador	+	+	-	-
	EEUU	+	-	-	-
	Honduras	+	+	-	-
	México	-	-	-	+
	Uruguay	+	-	-	-

+ Reportado

- No reportado

Fuente: Evans *et al.*, 2006a; Conroy, 2007; Klesius *et al.*, 2008 (datos no publicados).

8.1. Características microbiológicas

S. iniae es un cocobacilo grampositivo, catalasa negativo, en pares o cadenas. No móviles, susceptible a vancomicina, negativa a la reacción Voges-Proskauer (VP) para la producción de la enzima acetimetil carbinol, y no reaccionan sobre el medio bilis – escualina (BE), producen ácido y sorbitol, gas en caldo Mann Rogosa Sharp (MRS), y crecen a 45°C o en caldos conteniendo 6.5% de NaCl, sin embargo algunas cepas pueden mostrar débil crecimiento, positivos a la producción de leucina aminopeptidasa (LAP) y CAMP (test para aumentar la producción de beta hemólisis por *Streptococcus* usando *Staphylococcus aureus* (Evans *et al.*, 2006b).

Las principales características fenotípicas de las especies de *Streptococcus* se muestran en el cuadro 2 (Shoemaker *et al.*, 2006; Conroy, 2007).

Cuadro 2. Principales características fenotípicas diferenciales de varias especies de *Streptococcus* aisladas de tilapias enfermas en el Continente Americano

Característica / Prueba	Resultado			
	<i>S. iniae</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. constellatus</i>	<i>Streptococcus</i> spp. (*)
Morfología	cocos	cocos	cocos	cocos
Tinción de Gram	+	+	+	+
Motilidad	-	-	-	-
Catalasa	-	-	-	-
Hemólisis	+(beta)	+(beta)	-	(-)
Hidrólisis del almidón	+	-	-	-
Hidrólisis del hipurato	-	+	+	-
Bilis- escualina	-	-	-	-
Arginina dihidrolasa	-	+	+	+
Ácido de manitol	+	+	+	ND
Ácido de sorbitol	-	-	-	-
Voges-Praskauer	-	+	+	(+)
Leucina-aninopeptidasa	-	+	ND	(+)
Pirrolidínico-arilamidasa	+	-	ND	-
Crecimiento a 10° C	+	-	-	-
Crecimiento a 45° C	-	-	-	-
Crecimiento en NaCl al 6.5%	V	V	+	-
Bacitracina	R	S	R	ND
Vancomicina	S	S	R	S
Grupo de Lancefield	-	B	-	-

+ Positivo

- negativo

(+) típicamente positivo

(-) típicamente negativo

V variable

R resistente

S sensible

ND no se determinó

(*) aislado en México

Fuente: Shoemaker *et al.*, 2006; Conroy, 2007

8.2. Epidemiología

Fue inicialmente aislado en 1976 en delfines amazónicos de agua dulce (*Iniae geoffrensis*) que habitaban en el acuario de San Francisco y Nueva York (Pier y Madin, 1976). Estos animales presentaban lesiones cutáneas superficiales. En los años ochenta, se aisló una nueva especie del estreptococo, considerado el agente etiológico de meningoencefalitis agudas que afectaban a tilapias de cultivo en Israel, Taiwán y los Estados Unidos (Eldar *et al.*, 1994 y 1995a), causando una alta tasa de mortalidad entre los animales. Inicialmente a este patógeno se lo denominó *Streptococcus shiloi*, posteriormente, las características fenotípicas y genotípicas demostraron que se trataba del *Streptococcus iniae* (Eldar *et al.*, 1995b).

S. iniae puede afectar a varias especies de peces, incluso peces de mar (Boletín Epidemiológico de la OPS, 2000; Colorn *et al.*, 2002); sin embargo, diversos reportes realizados señalan que la tilapia es la especie más afectada (Baiano y Barnes, 2009).

En 1993, Kitao mostró que los peces que sobreviven a un brote de estreptococosis continúan como fuente permanente de la infección *in situ*. Una vez que esta enfermedad entra a una granja o a un centro de producción de tilapia, parece extremadamente difícil o imposible de erradicar.

8.3. Patogenia

8.3.1. Ruta de ingreso

En 1994, Chang demostró que *O. niloticus* era susceptible a la infección por *Streptococcus* después de sufrir heridas en la superficie de la piel, observando los niveles más altos de mortalidad cuando los peces se mantenían en aguas con una salinidad de 30‰ y a una temperatura de 25°C, o con salinidad de 15‰ a 30°C, indicando que la susceptibilidad de la tilapia a esta enfermedad se incrementa conforme sube tanto la salinidad como la temperatura del agua.

8.3.2. Factores de virulencia

Las recientes investigaciones moleculares de los factores que contribuyen a la virulencia de *S. iniae*; han identificado proteínas de superficie, polisacáridos capsulares, y productos extracelulares secretados; así como los genes regulatorios involucrados en su expresión, al interior y exterior de la célula (Baiano y Barnes, 2009) (Fig. 17).

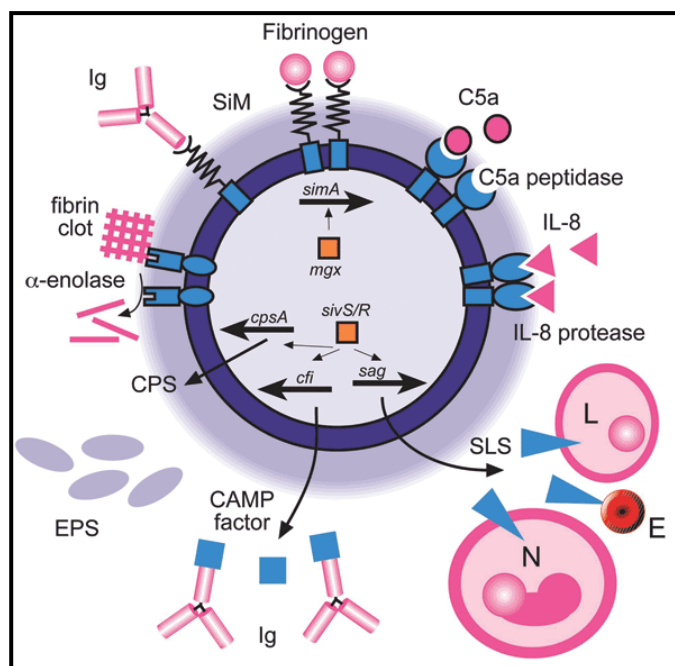


Figura 17. Factores de virulencia de *Streptococcus iniae* (Baiano y Barnes, 2009)

Proteína SiM: Las proteínas M son uno de los principales factores de virulencia dentro del grupo *Streptococcus A* (*S. pyogenes*: GAS). El alto nivel de diversidad de los tipos de genes *emm* (un gen hipervariable, que codifica la proteína M) ha contribuido al éxito de las infecciones causadas por GAS en humanos (Baiano y Barnes, 2009). La proteína M, como la de *Streptococcus iniae*, SiM, es también una candidata principal en la virulencia (Baiano *et al.*, 2008; Locke *et al.*, 2008).

La proteína SiM es una proteína espiral enroscada, que tiene una masa molecular de 53 kDa, sin embargo, se han descrito otras dos variantes, una con una inserción 1-aa entre los espirales y otra con una masa mayor de 59 kDa (Baiano *et al.*, 2008). Una variante adicional tiene un marco de lectura natural / terminación prematura del tipo SiMA 1 en una cepa de una tilapia infectada (Locke *et al.*, 2008).

La proteína M es una proteína de superficie que se une a fibrinógeno humano para proteger la bacteria de la actividad fagocítica (Baiano *et al.*, 2008).

Las proteínas SiM pueden también unirse a las inmunoglobulinas de trucha por la región Fc (Barnes *et al.*, 2003). Un estudio de intercambio alélico mostró que la proteína SiM es un factor principal de virulencia de *S. iniae*, que contribuye a la adherencia de las células epiteliales de los peces (Locke *et al.*, 2008), y también confirmó las observaciones tempranas que SiM contribuye a la resistencia de macrófagos (Baiano *et al.*, 2008).

C5a Peptidasa: Hidroliza el factor de complemento C5a, quimioatrayente de neutrófilos y, por tanto disminuye la habilidad del hospedero infectado para combatir la infección. C5a peptidasa es una proteína de superficie con un anclaje gram – positivo LPXTN. En GAS, C5a peptidasa es encontrada en cultivos sobrenadantes; sin embargo, esta observación no ha sido hecha para *S. iniae* (Locke *et al.*, 2008).

Interleucina-8 proteasa: IL-8 es producida en el hospedero como respuesta a estímulos tales como lipopolisacáridos, virus, y otras citoquinas. La proteasa IL-8 es una proteasa de la envoltura celular, capaz de degradar la quimiocina IL-8 e incrementar la resistencia a los neutrófilos y la diseminación de la enfermedad (Zinkernagel *et al.*, 2008).

Estreptolisina S: La habilidad de *S. iniae* para hemolizar eritrocitos y dañar las membranas de las células hospederas es producto de la actividad de citolisinas. La citolisina que posee *S. iniae* es homóloga a la estreptolisina S (SLS) de GAS (Fuller *et al.*, 2002). y afecta eritrocitos,

neutrófilos, linfocitos, y algunas tipos de tejidos en cultivo tisular (Nizet *et al.*, 2000), pero no tiene un rol en la resistencia a la fagocitosis ni en la adherencia epitelial e invasión (Locke *et al.*, 2007).

Las propiedades citotóxicas de SLS hacia las células de los peces y la presentación común de trauma cerebro vascular representa un factor principal de virulencia en la patogénesis de *S. iniae* (Locke *et al.*, 2007).

Factor CAMP: Los poros formadores de la toxina del factor CAMP actúan sinérgicamente con *Staphylococcus aureus* productores de esfingomilinas para producir un área distinta en forma de flecha de lisis completa de eritrocitos sobre agar sangre de ovino. El Factor CAMP también ha mostrado, unirse a inmunoglobulinas por la región Fc y además contribuir a la virulencia (Bolotin *et al.*, 2007).

Proteínas unidas a Inmunoglobulinas: Una proteína putativa como la proteína G (primera proteína identificada de grupo *Streptococcus* G), asociada a la pared celular de *S. iniae* fue capaz de unirse a las inmunoglobulinas de la trucha sólo cuándo creció en presencia de suero de trucha (Barnes *et al.*, 2003).

Cápsula: Uno de las vías más efectivas para que una bacteria pueda evadir la fagocitosis es por la producción del polisacárido capsular (CPS), las cepas con CPS son más virulentas que sus contrapartes no encapsuladas (Kanai *et al.*, 2006; Shutou *et al.*, 2007). La presencia de la cápsula también está involucrada en la inhibición de la deposición del complemento C3 (Miller y Neely, 2005).

Fosfoglucomutasa: Es una proteína 571-aa codificada por el gen *pgmA*, involucrada también en la biosíntesis capsular que interconvierte la glucosa 6-fosfato y glucosa 1-fosfato (Buchanan *et al.*, 2005).

Exopolisacárido: La composición cuantitativa de monosacáridos presentes en exopolisacáridos (EPS) es diferente de ésta encontradas en CPS (Eyngor *et al.*, 2008). La vacunación de rutina de peces en Israel ha originado nuevas cepas de *S. iniae* responsables de muertes colectivas en peces.

Estas nuevas cepas fueron originadas cuándo una cepa de vacuna autógena, KFP404, fue reemplazada por nuevas cepas KFP468, KFP477, y KFP523, las cuáles fueron

caracterizadas por un caldo de cultivo viscoso similar a lo observado con *S. thermophilus* usado en la producción de yogurt (Eyngor *et al.*, 2008).

La producción de EPS por las cepas sucesoras fue 5 veces más alta que la cepa de vacuna autógena. La vacunación de peces con los extractos de EPS suscitó una supervivencia de 78%, la cual fue similar a la tasa de supervivencia de 72%, cuando células enteras fueron usadas. Así, EPS parece ser antigénico y la producción excesiva se ha seleccionado para la vacunación (Eyngor *et al.*, 2008).

α Enolasa: La habilidad de *S. iniae* para cruzar tejidos a través de la activación del plasminógeno es facilitado por la enzima α enolasa (Kim *et al.*, 2007), un factor que contribuye con la virulencia de GAS (Pancholi y Fischetti, 1998).

La actividad proteolítica de la plasmina en la disolución de coágulos de fibrina permite a los patógenos migrar rápidamente a través de las matrices extracelulares (Eberhard *et al.*, 1999), y la α enolasa facilita la invasión a través de los tejidos del huésped (Lottenberg, 1997) y, por último, dentro del sistema circulatorio.

La α enolasa de *S. iniae* (50 kDa) es una enzima unida a plasmina / plasminógeno que es 97% similar a la α enolasa de *S. agalactiae* y GAS (Kim *et al.*, 2007).

8.3.3. Signos clínicos

Por lo general, las tilapias afectadas por estreptococosis muestran diferentes manifestaciones clínicas dependiendo de la especie de *Streptococcus* y del tipo o híbrido de tilapia de que se trate (Conroy, 2009). Según Sandoval *et al.* (2010), al parecer *Oreochromis niloticus* es más resistente a la estreptococosis que *Oreochromis aureus*, así como la manifestación de los signos clínicos son algo diferentes.

Los signos clínicos típicos pueden incluir anorexia, letargia (Romano y Mejía, 2003), melanosis en la piel, hiperemia y hemorragias petequiales en la región anal y sobre las aletas, lesiones hemorrágicas y necróticas en la piel y el tejido muscular, exoftalmos uni o bilateral con o sin hemorragias perioculares, y opacidad de la córnea (Evans *et al.*, 2006b; Conroy, 2009) (Fig. 17).

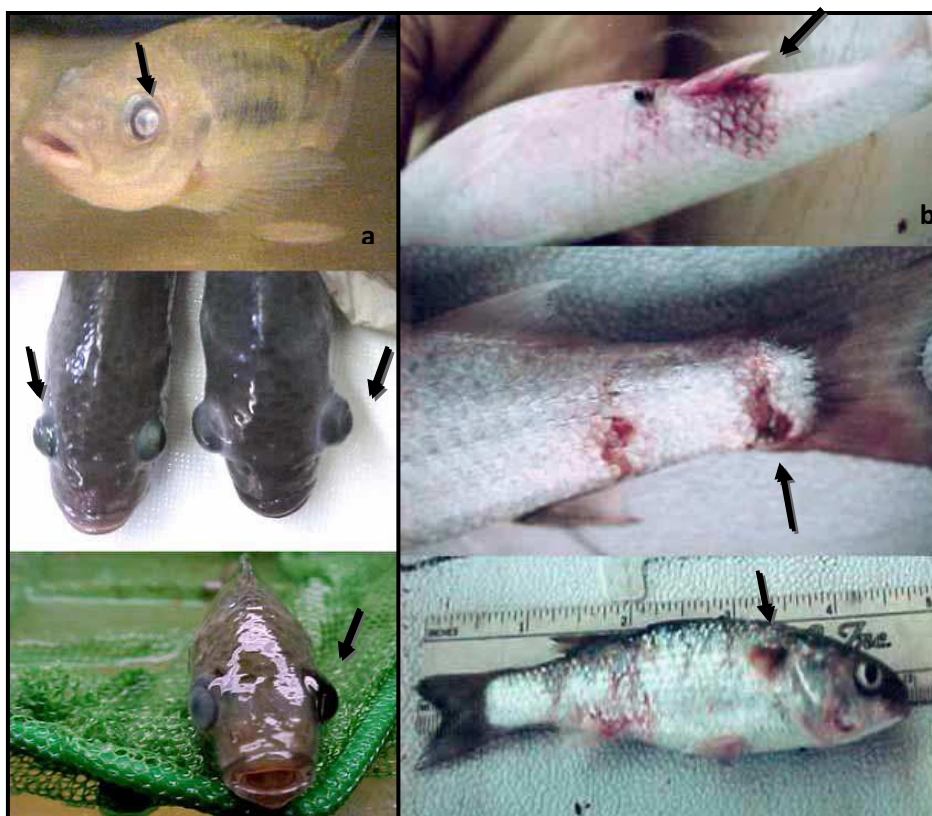


Figura 18. *Streptococcus* spp. Signos de enfermedad en tilapia niloticus: a. Enfermedad ocular; b. Lesiones de cuerpo y aletas en peces infectados (Evans *et al.*, 2006b).

Un signo característico es la presencia de movimientos natatorios erráticos y desorientados (Evans *et al.*, 2006a), principalmente en los peces moribundos, lo que ha dado origen al término “enfermedad de la tilapia loca”. La conducta anormal al nadar es causada por meningoencefalitis, resultante de la infección de cerebro y meninges por el *Streptococcus* invasivo (Conroy, 2009).

El exoftalmos generalmente se asocia con las primeras etapas de la enfermedad, con congestión y edema retrobulbares (Evans *et al.*, 2006a,b), acompañados de inflamación e hiperemia, necrosis de la coroides y del nervio óptico, lo que da como resultado la expulsión de material necrosado a través de la córnea ulcerada. También se puede encontrar opacidad o incluso pérdida total de la córnea (Conroy, 2009).

De acuerdo a la experiencia de Conroy (2009) reportó que, particularmente en América Latina, los signos clínicos y las manifestaciones patológicas de las tilapias enfermas pueden variar dependiendo de la especie de *Streptococcus* causante de la infección. (cuadro 3).

Cuadro 3. Principales manifestaciones clínicas y patológicas causadas por *Streptococcus* spp. en tilapias enfermas

<i>S. iniae</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. constellatus</i>
Por lo general causa infecciones crónicas con mortalidad sostenida a 24° C.	Por lo general causa infecciones crónicas con mortalidad sostenida a 28° C, que se puede convertir en aguda durante varios días, para luego repetrise cada 4 semanas	Causa infección crónica entre 28° C y 30° C, con mortalidad máxima durante varios días para luego recurrir a intervalos aproximados de 4 semanas.
Edema y hemorragia en meninges.	Edema y hemorragia en meninges en algunos casos	Muy rara vez se observa hemorragia en meninges.
Hematocrito marcadamente disminuido.	El hematocrito no siempre está afectado	Por lo general, el hematocrito no está afectado.
Exoftalmos severa uni o bilateral.	Exoftalmos severa uni o bilateral	Exoftalmos uni o bilateral.
Hemorragia periocular siempre presente en tilapias enfermas.	Hemorragia periocular presente casi siempre presente en tilapias enfermas	Muy rara vez se observa hemorragia periocular.
Lesiones necróticas en los filetes	Lesiones necróticas en los filetes	Lesiones necróticas en los filetes.
la pericarditis puede ser marcada; por lo general hay presencia de poliserositis.	Siempre se observa marcada poliserositis; suele haber presencia de pericarditis	Pericarditis muy marcada; también se puede detectar un cierto grado de poliserositis.

Fuente: Conroy, 2009

8.3.4. Lesiones

Las hemorragias cutáneas difusas o petequiales son frecuentes y si bien se observan en todo el cuerpo prevalecen en la región cefálica y caudal. Con cierta frecuencia se observa una esplenomegalia y el hígado se observa friable. En la cavidad craneal se puede ver la congestión difusa cerebral con líquido cefalorraquídeo hemorrágico (Romano y Mejía, 2003).

A la necropsia el bazo suele estar aumentado de volumen, el hígado y el riñón se ven pálidos y moteados con numerosas áreas de necrosis focal. Con frecuencia se observa miocarditis y pericarditis (Perera *et al.*, 1998) y poliserositis. La cavidad abdominal puede estar distendida y puede contener un exudado seroso y sanguinolento (Romano y Mejía, 2003). Los vasos sanguíneos branquiales por lo general están hiperémicos e infiltrados con macrófagos, en cuyo caso los filamentos de las branquias pueden mostrar hemorragias masivas y sufrir un proceso de necrosis que afecta amplias áreas branquiales, lo que causa mal olor y aumenta la mortalidad. El tracto intestinal también puede estar hiperémico y la mucosa puede presentar descamación continua (Conroy, 2009).

Los casos crónicos de estreptococosis en tilapia por lo general se asocian a granulomas (Conroy, 2009), algunos autores describen oftalmitis, presencia de granulomas meníngeos y focos inflamatorios renales (Perera *et al.*, 1998).

El análisis histológico muestra un característico cuadro septicémico con una marcada infiltración celular inflamatoria y numerosos cocos en la mayoría de los tejidos examinados. Predomina un cuadro meningoencefálico con dilatación de capilares meníngeos, extravasación de eritrocitos y densos infiltrados inflamatorios con predominio de granulocitos y macrófagos aunque también se observan linfocitos. Con técnicas de impregnación argéntica se puede ver abundantes cocos en el parénquima encefálico. En el hígado se observa una hepatitis focal intraséptica con focos de necrosis hepatocelular e infiltrados inflamatorios. En algunos casos se puede observar una periarteris hepática. En el bazo se observa disgregación de melanomacrófagos y presencia de cocos en los sinusoides esplénicos (Perera *et al.*, 1998).

8.4. Diagnóstico

Los métodos diagnósticos son varios desde las técnicas bioquímicas, bacteriológicas convencionales hasta técnicas moleculares (Romano y Mejía, 2003).

Alteraciones en la taxonomía y nomenclatura del género *Streptococcus* ha ocurrido como resultado de la llegada de técnicas moleculares empleadas para ayudar a delinear las diferencias en género y especie bacteriana. En adición, la similitud entre las características fenotípicas de catalasa negativa, cocos grampositivos, genera tal como *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* hemolítico, pueden causar confusión y mala identificación (Evans *et al.*, 2006).

Tanto *S. iniae* y *S. agalactiae* son positivos para LAP y CAMP. Para confirmar el diagnóstico de *S. iniae* y diferenciarlo entre *S. agalactiae*, usualmente crece a 10° C, no hidroliza hipurato pero hidroliza almidón, y no posee un grupo Lancefield (Evans *et al.*, 2006b).

S. iniae es siempre hemolítico sobre placas de agar sangre, mientras *S. agalactiae* puede ser hemolítico o no hemolítico. La prueba para hidrolizar almidón es esencial para la identificación de *S. iniae* y la diferenciación de otros organismos estreptococales que no hidrolizan almidón (Evans *et al.*, 2004).

S. iniae es siempre hemolítico sobre placas de agar sangre, mientras *S. agalactiae* puede ser hemolítico o no hemolítico. La prueba para hidrolizar almidón es esencial para la identificación de *S. iniae* y la diferenciación de otros organismos estreptococales que no hidrolizan almidón (Evans *et al.*, 2004).

Kits comerciales API 20 Strept, Raid Strept 32, API CH50 y Vitek son usados con frecuencia en la identificación presuntiva de estreptococos. Estos test comerciales, pueden no identificar *S. iniae*, como este organismo no está en la base de datos del sistema (Evans *et al.*, 2004).

Excelentes resultados, sin embargo, han sido obtenidos usando el sistema Biolog Hayward CA, USA para caracterización e identificación de *S. iniae* y *S. agalactiae* (Evans *et al.*, 2006b).

Klesius *et al.* (2006), desarrolló una rápida y sensible técnica monoclonal basada en anticuerpos para la detección de *S. iniae*. Varias técnicas moleculares han sido desarrolladas como rápidas, sensibles y específicos complementos para el diagnóstico convencional y protocolos taxonómicos para *S. iniae* y *S. agalactiae*. La técnica molecular incluye DNA RAPD, restricción del fragmento RFLP, AFLP y genoma completo hibridización ADN-ARN además de PCR son ampliamente estudiadas (Evans *et al.*, 2006b).

Secuencias primer específicas de PCR obtenidas de genes o fragmentos de DNA han sido exitosamente usados para identificar infecciones por *S. iniae* y *S. agalactiae* en peces (Berridge *et al.*, 2001; Mata *et al.*, 2004; Kawamura *et al.*, 2005).

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se encuentra estandarizada y con buenos resultados para uso diagnóstico (Goh *et al.*, 1998). La detección de anticuerpos contra el *S. iniae* por ELISA en tilapias fue recientemente descrito (Shelby *et al.*, 2001).

8.5. Tratamiento

S. iniae es sensible a numerosos antibióticos incluyendo oxitetraciclina, ciprofloxacina, amoxicilina-ácido clavulónico, penicilina, cloranfenicol, tetraciclina, rifampicina, sulfametoxazol trimetoprim, eritromicina y vancomicina (Evans *et al.*, 2006b).

Aislados de *S. iniae* son resistentes a eritromicina, amikacina ácido nalidíxico y la sensibilidad varia para gentamicina y ampicilina (Pier y Madin 1976, Eldar *et al.*, 1994, Vandamme *et al.*, 1997).

En los alevines de tilapia que presentaban mortalidad y signos clínicos causados por *S. iniae*, el tratamiento con florfenicol en la ración a dosis de 15 mg /kg de peso corporal/día, durante 10 días, incrementó significativamente la supervivencia a los 14 días post tratamiento,

en comparación con los testigos no medicados. Las posibilidades de mortalidad entre los testigos no medicados fueron 1.34 veces superiores a las observadas en los peces medicados (Gaikowski, 2009).

8.6. Prevención y Control

La incorporación de probióticos a los alimentos balanceados es una buena opción. Recientemente se han utilizado una mezcla de dos probióticos, *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus faecium*, que parecen mejorar el medio intestinal, disminuyen el estrés en los animales y generan alguna protección frente a la infección por parásitos y/o bacterias patógenas como el *S. iniae* (Tavares-Dias *et al.*, 2001).

Sin embargo, la mejor estrategia, como casi siempre sucede, es la vacunación apropiada de los animales. Cuando se menciona el uso apropiado, se está refiriendo al uso de la vacuna específica. Por lo tanto, hay que realizar una buena identificación del microorganismo ya que existen diferentes cepas y diferentes virulencia asociada a cada genotipo de *S. iniae* identificado (Fuller *et al.*, 2001). Es por eso que algunas vacunas parecen no tener éxito, se debe tener en cuenta que el sistema inmunológico de los peces es muy similar al de los mamíferos y que el reconocimiento en la fase específica de la respuesta inmune, sea ésta sea celular u humoral, es antígeno-dependiente, o sea, sólo se responde al determinante antigénico del antígeno presentado por células presentadoras de antígenos (Bachrach *et al.*, 2001).

IX. ESTADO SANITARIO DE LA TILAPIA EN EL PAÍS

El cultivo de tilapias en nuestro país tiene buenas perspectivas de desarrollo, utilizando recursos tanto de la costa como de la selva, sin embargo a pesar que su producción se ha ido incrementando y sus productos se exportan, los propios productores aún no están conscientes que paralelamente requieren invertir en desarrollar una política sanitaria que les permita producir de manera segura, el determinar el estatus sanitario permite aplicar medidas de prevención y control adecuados para la realidad del país y hacer programas de vigilancia epidemiológica para evitar diseminar e introducir enfermedades. Por otro lado, las investigaciones en sanidad son aún mucho menores que los realizados en la trucha arcoíris. Esta situación de deficiente investigación de enfermedades que afectan a los cultivos de tilapias sp. a la larga puede poner en peligro el desarrollo de esta actividad (Sandoval *et al.*, 2010).

De acuerdo a los informes sobre agentes bacterianos que afectan el cultivo de tilapias, se encuentran *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio sp.* y Piscirickettsia-like (probablemente del género *Francisella*). Sin embargo, estos estudios microbiológicos no evidencian la metodología del trabajo o el método diagnóstico empleado para afirmar la presencia de tales bacterias, por lo que no se consideran confiables. Lamentablemente, es la única información que se dispone en la actualidad (Sandoval *et al.*, 2010).

Respecto a los agentes bacterianos determinados en la tilapia sp. del país son seis, sin embargo, no fueron aisladas de brotes de enfermedades sino de peces que fueron identificados enfermos en las pozas. Esto es probablemente a que aún la presión de la producción intensiva en esta especie no es severa, sin embargo estas bacterias como *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, son reconocidas de causar importantes pérdidas económicas en la industria del cultivo de tilapias en el mundo (Sandoval *et al.*, 2010). Por otro

lado, aunque en nuestro medio aún no se ha diagnosticado otro patógeno de importancia que afecta el cultivo de tilapias es importante mencionar al *Streptococcus* (Sandoval *et al.*, 2010).

Por lo tanto, es importante estar alertas frente a la presencia de las mismas, realizar un adecuado manejo de bioseguridad y monitoreo constante que permita evaluar si hay un incremento de incidencias y prevalencias de los agentes asociados a enfermedad producida por las bacterias mencionadas. Estas bacterias se han aislado en varios de los países latinoamericanos en los cuales se cultivan tilapias y sus híbridos *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas spp.*, *Vibrio spp.* y otras especies de aeromonádidos móviles. Es importante hacer constar que aislados de *Vibrio spp.* han sido obtenidos a partir del contenido intestinal de “tilapias aparentemente sanas” en ambientes dulceacuícolas, por lo que esos peces podrían constituir portadores asintomáticos de la infección. Estas bacterias son componentes normales de la bacterioflora de tilapias, así como de su ambiente acuático, motivo por el cual son considerados patógenos facultativos u oportunistas, que producen la enfermedad cuando los peces son sometidos a condiciones de estrés (Sandoval *et al.*, 2010).

X. RECOMENDACIONES

De acuerdo a las nuevas normas que están siendo formuladas a nivel internacional en las que se restringe el uso de antibióticos y algunas sustancias químicas a fin de lograr productos para el consumo humano más naturales y amigables con el ambiente, se crea la imperiosa necesidad en la cual se deban incorporar el uso de vacunas, inmunoestimulantes y probióticos para reemplazar la necesidad de tratamientos a base de antibióticos u otros químicos, pero pesar de estas nuevas alternativas la industria siempre deberá mantener inevitablemente el sentido común en lo que se refiere a manejo de calidad de agua, calidad de suelos, alta calidad en las dietas y así reducir el estrés ambiental que se ofrece a los peces bajo cultivo, previniendo y minimizando de esta manera epizootias y pérdidas en la producción (Sandoval *et al.*, 2010).

La erradicación de un patógeno generalmente involucra despoblamiento, esterilización y repoblación de las facilidades, y aún después de la “esterilización” nunca se sabrá si se destruyeron todos los patógenos (Conroy, 2006).

Finalmente, para controlar los brotes de enfermedades es necesaria la participación de los sectores acuícolas, autoridades sanitarias oficiales, la comunidad, la región, las instituciones universitarias y laboratorios de diagnóstico que permitan, promover como principales vías de acción:

- Implementar normas mínimas de bioseguridad y aplicar los sistemas de bioseguridad en el centro de producción: rodaluvios, pediluvios, maniluvios. Uso de botas, ropa para la faena, restricción de ingreso al centro productivo etc.
- No manipular demasiado los organismos.

- Si desconoce el tipo de patógeno causante de la enfermedad, no medique. Envíe peces vivos enfermos en mínimo de 5 (según lo referido en truchas) a un laboratorio de diagnóstico de enfermedades para peces.
- Comunicarse inmediatamente con el Comité de sanidad para que lo apoye en la identificación del patógeno.
- Mantener las densidades adecuadas para el sistema de producción.
- Disminuir la densidad de las pozas afectadas, pero no mezcle peces sanos con enfermos.
- Proveer una nutrición adecuada.
- Tener las condiciones ideales de temperatura o bien proveer de esta con invernaderos, calentadores, etc.
- Monitorear de manera constante los parámetros físico-químicos del agua (temperatura, turbidez, O, NO, NH, pH).
- Monitorear el estado de salud de los peces 4 veces al año.
- Revisar los fondos de los estanques y en caso de ser necesario, sifonear o realizar el desazolve y el secado del mismo para evitar la acumulación de materia orgánica.
- Realizar el uso adecuado de antibióticos y vacunas. Procurar que sean aplicadas solo por personal capacitado y solo de ser necesario.
- Siempre se ha de efectuar un antibiograma en primer lugar, y la determinación de la concentración mínima inhibitoria (C.I.M. en $\mu\text{g/ml}$ = ppm) en segundo lugar, a fin de establecer la dosis a ser aplicada.
- Establecer el personal profesional debidamente capacitado y acreditado.
- Realizar la limpieza y desinfección total de material utilizado para el trabajo en los estanques y no trabajar en todos los estanques con el mismo material ya que se corre el riesgo de propagar enfermedades.
- Realizar la cuarentena requerida antes de meter los animales a su granja y revisión de los mismos para descartar enfermedades o portación de parásitos.
- Solicitar el apoyo a SANIPES e Instituciones ligadas a la sanidad en peces (Sandoval *et al.*, 2010).

XI. LITERATURA CITADA

1. **Acharya M, Maiti NK, Mohanty S, Mishra P, Samanta M. 2007.** Genotyping of *Edwardsiella tarda* isolated from freshwater fish culture system. *Comp. Immunol. Microbiol Infect Dis* 30: 33-40.
2. **Adams MR y Moss MO. 2000.** Food Microbiology. 2nd ed. Inglaterra: Cambridge. 479p.
3. **Afifi SH, Al-Thobiati S, Hazaa MS. 2000.** Bacteriological and histopathological studies on *Aeromonas hydrophila* infection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from fish farms in Saudi Arabia. *Assiut Vet Med J* 84: 195-205.
4. **Albert, MJ, Ansaruzzaman M, Talukdar K, Chopra AK, Kuhn I, et al. 2000.** Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *J Clin Microbiol* 38: 3785-3790.
5. **Amaro C. 2010.** Patógenos de animales acuáticos de interés en salud pública y acuicultura. *Act SEM* 50: 36-39.
6. **Angka SL, Lam TJ, Sin YM. 1995.** Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquacult* 30: 103-112.
7. **Aranishi F y Mano N. 2000.** Antibacterial cathepsins in different types of ambicoloured Japanese flounder skin. *Fish Shellfish Immunol* 10: 87-89.
8. **Ardó L, Yin G, Xu P, Váradi L, Szigeti G, et al. 2008.** Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the nonspecific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 275: 26-33.
9. **Ariel E y Owens L. 1997.** Epizootic mortalities in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Dis Aquat Org* 29: 1-6.
10. **Ascencio F, Ljungh A, Wadstrom T. 1991.** Comparative study of extracellular matrix protein building to *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish and human infection. *Microb* 7 (7): 47-55.

11. **Atkinson HM y Trust T. 1980.** Hemagglutination properties and adherence ability of *Aeromonas hydrophila*. Infect Immun 27: 936-948.
12. **Austin B y Austin DA. 2007.** Bacterial fish pathogens: Diseases of farmed and wild fish. 4th ed. New York: Springer. Chichester UK, Alemania. 594 p.
13. **Awad ES. 2010.** Studies on plant based dietary supplements for control of *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). [Internet]. Disponbile: http://www.ros.hw.ac.uk/bitstream/10399/2342/1/AwadES_0810_sls.pdf
14. **Bach R, Chen PK, Chapman CB. 1978.** Changes in the spleen of the channel catfish *Ictalurus punctatus* Rafinesque induced by *Aeromonas hydrophila*. J Fish Dis 1: 205-207.
15. **Bachrach G, Zlotkin A, Hurvitz A, Evans DL, Eldar A. 2001.** Recovery of *Streptococcus iniae* from diseased fish previously vaccinated with a streptococcus vaccine. Appl Environ Microbiol 67: 3756–3758.
16. **Baiano J y Barnes A. 2009.** Towards control of *Streptococcus iniae*. Emerg Infect Dis 15(12): 1891-1896.
17. **Baiano J, Tumbol RA, Umapathy A, Barnes A. 2008.** Identification and molecular characterisation of a fibrinogen binding protein from *Streptococcus iniae*. BMC Microbiol. 8:67.
18. **Baltazar PM, 2007.** La tilapia en el Perú: acuicultura, mercado, y perspectivas. Rev Perú Biol 13(3): 267-273.
19. **Baltazar PM y Palomino AR. 2004.** Manual de cultivo de tilapia. Acuerdo de Colaboración Institucional AECI/PADESPA – FONDEPES. Sub proyecto: Programa de Transferencia de Tecnología en Acuicultura para Pescadores Artesanales y Comunidades Campesinas. 115 p.
20. **Barnes AC, Horne MT, Ellis AE. 2003.** *Streptococcus iniae* express a cell surface non-immune trout immunoglobulin-binding factor when grown in normal trout serum. Fish Shellfish Immunol.15: 425-431.
21. **Baudin-Laurencin F y German E. 1987.** Experimental infection of rainbow trout, *Salmo gairdneri* R., by dipping in suspensions of *Vibrio anguillarum*, ways of bacterial penetration, influence of temperature and salinity. Aqua 67: 203-205.
22. **Begue RE, Castellares G, Hayashi KE, Ruiz R, Meza R, et al. 1994.** Diarrheal disease in Perú after the introduction of cholera. Am J Trop Med Hyg 51: 585-589.
23. **Berg RW y Anderson AW. 1972.** Salmonellae and *Edwardsiella tarda* in gull feces a source of contamination in fish processing plants. Appl Microbiol 24: 501-503.

24. **Berridge BR, Bercovier H, Frelief PF. 2001.** *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile* 16S-23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR. *Vet Microb* 78: 165-173.
25. **Birkbeck TH, Bordevik M, Froystad MK, Baklien A. 2007.** Identification of *Francisella* sp. from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. *J Fish Dis* 30: 505-507.
26. **Bisharat N, Agmon V, Finkelstein R, Raz R, Ben-Dror G, et al. 1999.** Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. *Lancet* 354: 1421-1424.
27. **Bisharat N. 2002.** *Vibrio vulnificus* infections can be avoided. *IMAJ* 4: 631-633.
28. **Boletín Epidemiológico/OPS. 2000.** Mortalidad de peces en países del Caribe del Sureste. 21: 8-10.
29. **Bolotin S, Fuller JD, Bast DJ, de Azavedo JC. 2007.** The two component system *sivS/R* regulates virulence in *Streptococcus iniae*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 51: 547-54.
30. **Buchanan JT, Stannard JA, Lauth X, Ostland VE, Powell HC, et al. 2005.** *Streptococcus iniae* phosphoglucosyltransferase is a virulence factor and a target for vaccine development. *Infect Immun* 73: 6935-6944.
31. **Cahill MM. 1990.** Virulence factors in motile *Aeromonas* species. *J Appl Bacteriol* 69: 1-16.
32. **Cartwright GA, Chen D, Hanna PJ, Gudkovs N, Tajima K. 1994.** Immunodiagnosis of virulent strains of *Aeromonas hydrophila* associated with epizootic ulcerative syndrome (EUS) using monoclonal antibody. *J Fish Dis* 17: 123-133.
33. **Chang PH, Plumb JA. 1996.** Effects of salinity on streptococcus infection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J Appl Aquacult* 6: 39-45.
34. **Chern RS y Chao CB. 1994.** Outbreaks of a disease caused by rickettsia-like organism in cultured tilapias in Taiwan. *Fish Pathol* 29: 61-71.
35. **Chopra AK y Houston CW. 1999.** Enterotoxins in *Aeromonas*-associated Gastroenteritis. *Microb Infect* 1: 1129-1137.
36. **Cipriano R. 2001.** *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. *Revis Fish Dis Leaflet* 68: 25 p.
37. **Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. 2005.** *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infect Immun.* 73: 5892-5902.
38. **Clemens DL y Horwitz MA. 2007.** Uptake and intracellular fate of *Francisella tularensis* in human macrophages. *Ann N Y Acad. Sci* 1105: 160-186.
39. **Coles BM, Stroud RK, Shegbeby S. 1978.** Isolation of *Edwardsiella tarda* from three Oregon sea mammals. *J Wildlife Dis* 14: 339-341.

40. **Colquhoun DJ y Duodu S. 2011.** Francisella infections in farmed and wild aquatic organisms. *Vet Res* 42(45): 1-15.
41. **Colorn A, Diamant A, Eldar A, Kvitt H, Zlotkin. 2002.** *Streptococcus iniae* infections in red sea cage-cultured and wild fishes. *Dis Aquat Organ* 49: 165-170
42. **Conroy G y Conroy DA. 2006.** Bacterial haemorrhagic septicaemia in tilapias. *Aquacult Health Int* 7: 7-8.
43. **Conroy G. 2007.** The Streptococcus “milleri” group in tilapias: More than a mere mouthful. *Aquacult Health Int.* 10: 19-20.
44. **Conroy G. 2009.** Estreptococosis en tilapia: Prevalencia de las especies de Streptococcus en América latina y sus manifestaciones patológicas. En: *Memorias de Streptococcus en peces de aguas cálidas.* 3: 15-20.
45. **Crosa J. 1989.** Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbial Rev* 53: 517-530.
46. **Darwish A, Newton JC, Plumb JA. 2001.** Effect of incubation temperature and salinity on expression of the outer membrane protein profile of *Edwardsiella tarda*. *J Aqua An Health* 13: 269-275.
47. **Darwish AM, Ismaiel AA, Newton JC, Tang J. 2004.** Identification of *F. columnare* by a species-specific polymerase chain reaction and remaining of ATCC 43622 strain to *F. johnsoniae*. *Molecular and cellular probes.* 81: 421-427.
48. **Daskalov H. 2006.** The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *J Food Cont* 17: 474-483.
49. **Dávalos S, Natividad I, Vazquez C, Quiñónez E. 2005.** Patógeno oportunista *Vibrio vulnificus*. *Revista digital universitaria.* 6(4): 1-10.
50. **Delamare AP, Echeverrigaray S, Duarte KR, Gomes LH, Costa SO. 2002.** Production of a monoclonal antibody against *Aeromonas hydrophila* and its application to bacterial identification. *J Appl Microbiol* 92: 936-940.
51. **Dooley JS y Trust TJ. 1988.** Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* strains virulent for fish: identification of a surface array protein. *J Bacter* 17: 499-506.
52. **Dubey RS y Sanyal SC. 1979.** Characterisation and neutralisation of *Aeromonas hydrophila* enterotoxin in the rabbit ileal-loop model. *J Med Microbiol* 12: 347-354.
53. **Eberhard T, Kronvall G, Ullberg MB. 1999.** Surface bound plasmin promotes migration of *Streptococcus pneumoniae* through reconstituted basement membranes. *Microb Pathog* 26: 175-181.
54. **Eissa IA, Badran AF, Moustafa M, Fetaih H. 1994.** Contribution to motile *Aeromonas* septicemia in fish. *Am J Vet Rs.* 39: 1384-1386.

55. **El-Ashram AM y El-Boshy ME. 2008.** Assesment of dietary bovine lactoferrin in enhancement of immune function ad disease resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. 1097-1107.
56. **El-Seedy FR, Hassan WH, El-Neewery HA, Husien M. 2009.** A study on the biological characteristics of *Listonella anguillarum* and *Vibrio vulnificus* extracellular products. BS Vet Med 19(2): 53-61.
57. **El-Yazeed HA y Ibrahim MD. 2009.** Studies on *Edwarsiella tarda* infection in catfish and tilapia nilotica. BS Vet Med J. 19(1): 44-50.
58. **Eldar A, Bejerano Y, Bercovier H. 1994.** *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing meningoencephalitis in fish. Curr Microbiol 28: 139-143.
59. **Eldar A, Bejerano Y, Livoff A, Horovitz A, Bercovier H. 1995a.** Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. Vet Microbiol 43: 33-40.
60. **Eldar, A, Frelie PF, Assenta L, Varner PW, Lawhon S, Bercovier H. 1995b.** *Streptococcus shiloi*, the name of an agent causing septicemic infection in fish, is a junior synonym of *Streptococcus iniae*. Int. J Syst Bacteriol 45: 840-842.
61. **Evans JJ, Wiedenmayer AA, Klesius PH, Shoemaker CA. 2004.** Survival of *Streptococcus agalactiae* from frozen fish following natural and experimental infections. Aquaculture 233: 15-21.
62. **Evans JJ, Pasnik D, Klesius PH, Shoemaker CA. 2006a.** Identification and epidemiology of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* in tilapias, *Oreochromis* spp. Proceedings of the 7th International Symposium on Tilapias in Aquaculture, ISTA 7, 2006:25-42.
63. **Evans J, Klesius PH, Shoemaker C. 2006b.** Streptococcus in warm- water fish. Aquacult Health Inter 7: 10-14.
64. **Ewing WH, McWhorter AC, Escobar MR, Lubin AH. 1965.** Edwardsiella, a new genus of Enterobacteriaceae based on a new species, *E. tarda*. Int Bull Bacteriol Nomen and Taxon 15: 33-38.
65. **Eyngor M, Tekoah Y, Shapira R, Hurvitz A, Zlotkin A, Lublin A, et al. 2008.** Emergence of novel *Streptococcus iniae* exopolysaccharide-producing strains following vaccination with nonproducing strains. Appl Environ Microbiol 74: 6892-6897.
66. **Faktorovich KA. 1969.** Histological changes in the liver, kidneys, skin and brain of fish sick with red rot. In: Faktorovich KA, eds. Infectious Diseases of fish and their control, division of fisheries research. Washington: p. 83-101.

67. **Falcón RM, Carvalho HF, Joazeiro PP, Gatti MS, Yano T. 2001.** Induction of apoptosis in HT29 human intestinal epithelial cells by the cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila*. *Biochem Cell Biol.* 79(4): 525-531.
68. **Feng JB, Jia XP, Li LD. 2008.** Tissue distribution and elimination of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) after a single oral administration in freshwater and seawater at 28 °C. *Aquacult* 276: 29-35.
69. **Foley JE y Nieto NC. 2009.** Tularemia. *Vet Microbiol.* 140: 332-338.
70. **Fortier AH, Green S J, Polsinelli T, Jones TR, Crawford RM, et al. 1994.** Life and death of an intracellular pathogen: *Francisella tularensis* and the macrophage. *Immunol Ser* 60: 349-361.
71. **Fouz B, Alcaide E, Barrera R, Amaro C. 2002.** Susceptibility of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to vibriosis due to *Vibrio vulnificus* biotype 2 (serovar E), *Aqua.* 212: 21-30.
72. **Fukuda Y, Okamura A, Nishiyama M, Kawakami H, Kamaishi T, et al. 2002.** Granulomatosis of cultured three-line grunt *Parapristipoma trilineatum* caused by an intracellular bacterium. *Fish Pathol* 37: 119-124.
73. **Fuller JD, Bast DJ, Nizet V, Low DE, De Azavedo JC. 2001.** *Streptococcus iniae* virulence is associated with a distinct genetic profile. *Infect and Imm* 69: 1994-2000.
74. **Fuller JD, Camus AC, Duncan CL, Nizet V, Bast DJ, Thune RL, et al. 2002.** Identification of a streptolysin S-associated gene cluster and its role in the pathogenesis of *Streptococcus iniae* disease. *Infect Immun* 70: 5730-5739.
75. **Gaikowski MP. 2009.** Uso de alimento medicado con Aquaflor (florfenicol) para controlar la mortalidad causada por *Streptococcus iniae* en tilapia (*Oreochromis* spp.): Eliminación de residuos y efectividad en campo. En: *Memorias. Manejo de Streptococcus en peces de aguas cálidas.* 5: 27-38.
76. **Galal N, Ismail S, Khalil RH, Soliman MK. 2005.** Studies on edwardsiella infection in *Oreochromis niloticus*. *Egyp J Aquat Res* 31(1): 460-471.
77. **García y Landgraf. 1998.** Virulence Factors and Pathogenicity of *Vibrio vulnificus* strains isolated from seafood. *J Appl Microbiol* 64: 747-751.
78. **Goh S.H, Driedger D, Gillet S, Low D.E, Hemmingsen SM, et al. 1998.** *Streptococcus iniae*, a Human and Animal Pathogen: Specific identification by the chaperonin 60 gene identification method. *J Clinical Microb* 36: 2164-2166.
79. **Grimes DJ, Gruber SH, May EB. 1985.** Experimental infection of lemonsharks, *Negaprion brevirostris* (poey), with *Vibrio* species. *J Fish Dis* 8: 173-180.

80. **Grizzle JM y Kiryu Y. 1993.** Histopathology of gill, liver and páncreas, and serum enzyme levels of channel catfish infected with *Aeromonas hydrophila* complex. J Aquat Anim Health. 5: 36-50.
81. **Gulig PA, Bourdage KL, Starks AM. 2005.** Molecular Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. J Microb 43: 118-131.
82. **Han HJ, Kim DH, Lee DC, Kim SM, Park SI. 2006.** Pathogenicity of *Edwardsiella tarda* to olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel). J Fish Dis 29: 601-609.
83. **Harikrishnan R y Balasundaram C. 2005.** Modern trends in *Aeromonas hydrophila* disease management with fish. Rev Fish Sci. 13: 281-320.
84. **Harris-Young L, Tamplin M, Fisher W, Mason W. 1983.** Effects of physiochemical factors and bacterial colony morphology on association of *Vibrio vulnificus* with haemocytes of *Crassostrea virginica*. Appl Environ Microb 59(4): 1012-1017.
85. **Hird DW, Diesch SL, McKinnell RG, Gorham E, Martin FB, et al. 1983.** *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas hydrophila* in Minnesota frogs and tadpoles (*Rana pipiens*). Appl Environ Microbiol 46: 1423-1425.
86. **Hirono I, Tange N, Aoki T. 1997.** Iron-regulated haemolysin gene from *Edwardsiella tarda*. Mol Microbiol 24: 851-856.
87. **Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley JT, Williams ST. 1994.** Family Enterobacteriaceae. In: Holt JG, eds. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 9th ed. USA: Baltimore. p 175–194.
88. **HØi L, Larsen J, Dalsgaard I, Dalsgaard A. 1999.** *Vibrio vulnificus* in Denmark isolation, identification and characterization. [Internet]. Disponible en: <http://www2.mst.dk/udgiv/Publications/1999/87-7909-344-2/pdf/87-7909-343-4.pdf>
89. **Horenstein S, Smolowitz R, Uhlinger K, Roberts S. 2004.** Diagnosis of *Edwardsiella tarda* infection in oyster toadfish (*Opsanus tau*) held at the Marine Resources Center. Biol. Bull. Woods Hole Mass. 207:171.
90. **Horne MT y Baxendale A. 1983.** The adhesion of *Vibrio anguillarum* to host tissues and its role in pathogenesis. J Fish Dis 6: 461-471.
91. **Hsieh CY, Tung MC, Tu C, Chang CD, Tsai SS. 2006.** Enzootics of visceral granulomas associated with Francisella-like organism infection in tilapia (*Oreochromis spp.*). Aquaculture. 254: 129-138.
92. **Huizinga HW, Esch GW, Hazen TC. 1979.** Histopathology of red-sore disease (*Aeromonas hydrophila*) in naturally and experimentally infected largemouth bass *Micropterus salmoides* (Laépède). J Fish Dis 2: 263-277.

93. **Hutchison ZL. 2010.** A comparison of methods and characterization of real-time PCR for the detection of non-cholera vibrios; *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. [Internet]. Disponible en: <http://www.kcl.ac.uk/sspp/departments/geography/study/masters/dissertationhutchison.pdf>.
94. **Huys G, Pearson M, Kampfer P, Denys R, Cnockaert M, et al. 2003.** *Aeromonas hydrophila* subsp. *ranae* subsp. Nov., isolated from septicemic farmed frogs in Thailand. Int J Syst and Evol Micr 53: 855-891.
95. **Janda JM. 1991.** Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. Clinic Microb Rev 4(4): 397-410.
96. **Janda JM, Abbott SL, Kroske-Bystrom S, Cheung WK, Powers C, et al. 1991.** Pathogenic properties of *Edwardsiella* species. J Clin Microbiol 29: 1997-2001.
97. **Jones MK y Oliver JD. 2009.** *Vibrio vulnificus*: Disease and pathogenesis. Infect Immun 77: 1723-1733.
98. **Jonjareanjai M, Assawawongkasem N, Chansue N. 2009.** *In vitro* antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased ornamental fish. Thai J Vet 39(3): 225-229.
99. **Kamaishi T, Fukuda Y, Nishiyama M, Kawakami H, Matsuyama T, et al. 2005.** Identification and pathogenicity of intracellular *Francisella* bacterium in three-line grunt *Parapristipoma trilineatum*. Fish Pathol. 40: 67-71.
100. **Kanai K, Notohara M, Kato T, Shutou K, Yoshikoshi K. 2006.** Serological characterization of *Streptococcus iniae* strains isolated from cultured fish in Japan. Fish Pathol 4: 57-66.
101. **Kanno T, Nakai T, Muroga K. 1989.** Mode of transmission of vibriosis among Ayu, *Plecoglossus altivelis*. J Aquat Anim Health. 1: 2-6.
102. **Kawai K, Liu Y, Ohnishi K, Oshima S. 2004.** A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate. Vacc 22: 3411-3418.
103. **Kawamura Y, Itoh Y, Mishima N, Ohkusu K, Kasai H, Ezaki T. 2005.** High genetic homogeneity of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficilis*: Reclassification of *S. difficilis*. Int J System Evol Microb 55: 961-965.
104. **Kay W, Petersen BO, Duus J, Perry MB, Vinogradov E. 2006.** Characterization of the lipopolysaccharide and beta-glucan of the fish pathogen *Francisella victoria*. FEBS J 273: 3002-3013.
105. **Khalil AH y Mansour EH. 1997.** Toxicity of crude extracellular products of *Aeromonas hydrophila* in tilapia. *Tilapia nilotica*. Lett Appl Microbiol 25: 269-273.

107. **Kim MS, Choi SH, Lee EH, Nam YK, Kim SK. 2007.** A enolase, a plasmin (ogen) binding protein and cell wall associating protein from a fish pathogenic *Streptococcus iniae* strain. *Aquaculture*. 265: 55-60.
108. **Kirov SM. 2003.** *Aeromonas* species. In Hocking AD, eds. Foodborne microorganisms of public health significance. 6th ed. Australia: NSW. p 553-575.
109. **Kitao T. 1993.** Streptococcal infections. In: Inglis V, Roberts R, Bromage NR, eds. Bacterial Diseases of Fish. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications. p 196-210.
110. **Klesius PH, Evans JJ, Shoemaker CA, Yeh H, Goodwin AE, et al. 2006.** Rapid detection and identification of *Streptococcus iniae* using a monoclonal antibody-based indirect fluorescent antibody technique. *Aquacult*: 180-186.
111. **Klesius PH, Shoemaker CA, Evans JJ. 2008.** Streptococcus: A worldwide fish health problem. Proceedings of the 8th International Symposium on Tilapias in Aquaculture, ISTA 8(1): 83-107.
112. **Kokubo T, Iida T, Wakabayashi H. 1990.** Production of siderophore by *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathol* 17: 243-256.
113. **Kourany M, Vasquez MA, Saenz R. 1977.** Edwardsiellosis in man and animals in Panamá: clinical and epidemiological characteristics. *Am J Tropic Med and Hyg* 26: 1183-1190.
114. **Kunttu. 2010.** Characterizing the bacterial fish pathogen *Flavobacterium columnare*, and some factors affecting its pathogenicity. [Internet]. Disponible en: <http://www.dissertations.jyu.fi/studbiol/9789513938673.pdf>.
115. **Lara-Flores M. 2003.** Aislamiento e identificación de microorganismos nativos del tracto intestinal de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) con potencial probióticos. Tesis de doctorado. México: Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN Unidad de Mérida. 135 p.
116. **Leung KY, Yeab IV, Lam TJ, Sin YM. 1994.** Serum resistance as a good indicator for virulence in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from diseased fish in South East Asia. *J Fish Dis* 18: 511-518.
117. **Leung KY, Lim T M, Lam TJ, Sin YM. 1996.** Morphological changes in carp epithelial cells infected with *Aeromonas hydrophila*. *J Fish Dis* 19: 167-174.
118. **Ling SH, Wang XH, Xie L, Lim TM, Leung KY. 2000.** Use of green fluorescent protein (GFP) to track the invasive pathways of *Edwardsiella tarda* in the *in vivo* and *in vitro* fish models. *Microb* 146: 7-19.
119. **Ling SH, Wang XH, Lim TM, Leung KY. 2001.** Green fluorescent protein-tagged *Edwardsiella tarda* reveals portal of entry in fish. *FEMS Microbiol Let* 194: 239-243.

120. **Liu Y, Oshima S-I, Kurohara K, Ohnishi K, Kawai K. 2005.** Vaccine efficacy of recombinant GAPDH of *Edwardsiella tarda* against edwardsiellosis. *Microbiol Immunol* 49: 605-612.
121. **Liu Y, Oshima S-I, Kawai K. 2007.** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Edwardsiella tarda* has protective antigenicity against *Vibrio anguillarum* in Japanese flounder. *Dis Aquat Org* 75: 217-220.
122. **Ljungh A, Eneroth P, Wadstrom T. 1982a.** Steroid secretion in adrenal Y1 cells exposed to *Aeromonas hydrophila* enterotoxin. *FEMS Microbiol Lett* 15: 141-144.
123. **Ljungh A, Eneroth P, Wadstrom T. 1982b.** Cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Toxicon* 20: 787-794.
124. **Locke JB, Colvin KM, Varki N, Vicknair MR, Nizet V, Buchanan JT. 2007.** *Streptococcus iniae* β -hemolysin streptolysin S is a virulence factor in fish infection. *Dis Aquat Org* 76: 17-26.
125. **Locke JB, Aziz RK, Vicknair MR, Nizet V, Buchanan JT. 2008.** *Streptococcus iniae* M-like protein contributes to virulence in fish and is a target for live attenuated vaccine development. *PLoS One*. 3(7): 1-13.
126. **Longyant S, Prahkarnkao, Meevothisom V, Rengpipat S, Rukpratanporn, et al. 2007.** Identification of *Aeromonas hydrophila* infection with specific monoclonal antibodies. *Mj Int J Sci Tech* 1(2): 107-119.
127. **Lottenberg R. 1997.** A novel approach to explore the role of plasminogen in bacterial pathogenesis. *Trends Microbiol.* 466-467.
128. **Low KW, Goh SG, Lim TM, Sin YM, Leung KY. 1998.** Actin rearrangements accompanying *Aeromonas hydrophila* entry into cultured fish cells. *J Fish Dis* 1(11): 55-65.
129. **Mahmud ZH, Wright AC, Mandal SC, Dai J, Jones MK, et al. 2010.** Genetic characterization of *Vibrio vulnificus* strains from tilapia aquaculture in Bangladesh. *Appl Environ Microb* 76(14): 4890-4895.
130. **Maki JS, Patel G, Mitchell R. 1998.** Experimental pathogenicity of *Aeromonas* spp. for the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, *Current Microbiol.* 3: 19-23.
131. **Mata AI, Gibello A, Casamayor A, Blanco MM, Domínguez y Fernández-Garayzábal JF. 2004.** Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *Appl Environ Microb* 70: 3183-3187.
132. **Mateo E, Castro T, Sierralta V. 2011.** Enfermedad bacteriana de tipo granulomatosa en tilapia cultivada en jaulas flotantes. [Internet]. Disponible en: [http:](http://)

www.lamolina.edu.pe/eventos/pesqueria/acuicultura/2011/descargas/25_Auxiliar2/G2.pdf.

133. **Mathew JA, Tan YP, Srinivasa Rao PS, Lim TM, Leung KY. 2001.** *Edwardsiella tarda* mutants defective in siderophore production, motility, serum resistance and catalase activity. *Microb* 147: 449-457.
134. **Matsche Ma y Grizzle LM. 1999.** Early Changes in pigmented macrophages in head kidney of channel catfish infected with *Aeromonas hydrophila*. *J Aqua Anim Health* 11: 253-261.
135. **Matsuyama T y Iida T. 1999.** Degranulation of eosinophilic granular cells with possible involvement in neutrophil migration to site of inflammation in tilapia. *Dev Comp Immunol* 23: 253-261.
136. **Mauel MJ, Miller DL, Styer E, Pouder DB, Yanong RP, et al. 2005.** Occurrence of Piscirickettsiosis-like syndrome in tilapia in the continental United States. *J Vet Diagn Invest* 17: 601-605.
137. **Mauel MJ, Soto E, Moralis JA, Hawke J. 2007.** A piscirickettsiosis-like syndrome in cultured Nile tilapia in Latin America with *Francisella* spp. as the pathogenic agent. *J Aquat Anim Health*. 19: 27-34.
138. **Merino S, Rubires X, Aguilar A, Tomas JM. 1997.** The role of flagella and motility in the adherence and invasion to fish cell lines by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34 strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 151: 213-217.
139. **Meyer FP y Bullock GL. 1973.** *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Appl Microbiol* 25: 155-156.
140. **Mikalsen J, Olsen AB, Tengs T, Colquhoun DJ. 2007.** *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* subsp. nov., isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L). *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 1960-1965.
141. **Mikalsen J y Colquhoun D J. 2009.** *Francisella asiatica* sp. nov. isolated from farmed tilapia (*Oreochromis* sp.) and elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* to species rank as *Francisella noatunensis* comb. nov. sp. nov. *IJSEM* 25:
142. **Miller JD y Neely MN. 2005.** Large-scale screen highlights the importance of capsule for virulence in the zoonotic pathogen *Streptococcus iniae*. *Infect Immun* 73: 921-934.
143. **[MINCETUR] 2011.** Lima: Ministerio de Comercio Exterior y Turismo. Plan Estratégico Nacional Exportador 2003-2013. [Internet]. Disponible en: <http://www.mincetur.gob.pe/comercio/otros/penx/pdfs/Tilapia.pdf>.
144. **Mohamed MH y Ahmed N. 2011.** Pathological evaluation of probiotic, *Bacillus subtilis*, against *Flavobacterium columnare* in tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) fish in Sharkia governorate, Egypt. *J Am Sc* 7(2): 244-256.

145. **Mohanty BR y Sahoo PK. 2007.** Edwardsiellosis in fish: A brief review. J Biosci 32: 1331-1344.
146. **Neves MS, Nunes MP, Milhomem AM. 1994.** Aeromonas species exhibit aggregative adherence to Hep-2 cells. J Clin Microbiol 32: 1130-1131.
147. **Nielsen ME, Høi L, Schmidt AS, Qian D, Shimada T, et al. 2001.** Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile Aeromonas species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang province of China? Dis Aquat Org 46: 23-29.
148. **Nizet V, Beall B, Bast DJ, Datta V, Kilburn L, Low DE, et al. 2000.** Genetic locus for streptolysin S production by group A *Streptococcus*. Infect Immun. 68:4245-4254.
149. **Oakey HJ, Gibson LF, George AM. 1999.** DNA probes specific for *Aeromonas hydrophila* (HG1). J Appl Microbiol 86: 187-193.
150. **Oliver JD, Wear JE, Thomas MB, Warner M, Linder K. 1986.** Production of extracellular enzymes and cytotoxicity by *Vibrio vulnificus*. Diagn Microbiol Infect Dis 5: 99-111.
151. **Olsen AB, Mikalsen J, Rode M, Alfjorden A, Hoel E, et al. 2006.** A novel systemic granulomatous inflammatory disease in farmed Atlantic cod, *Gadus morhua* L., associated with a bacterium belonging to the genus Francisella. J Fish Dis 29: 307-311.
152. **Olsson JC, Joborn A, Westerdahl A, Blomberg L, Kjelleberg S, et al. 1996.** Is the turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), intestine a portal of entry for the fish pathogen *Vibrio anguillarum*? J Fish Dis 19: 225-234.
153. **Ootsubo M, Shimizu T, Tanaka R, Sawabe T, Tajima K, et al. 2002.** Oligonucleotide probe for detecting Enterobacteriaceae by *in situ* hybridization. J Appl Microbiol 93: 60-68.
154. **Ostland VE, Stannard JA, Creek JJ, Hedrick RP, Ferguson HW, et al. 2006.** Aquatic Francisella-like bacterium associated with mortality of intensively cultured hybrid striped bass *Morone chrysops* x *M. saxatilis*. Dis Aquat Organ 72: 135-145.
155. **Ottem KF, Nylund A, Karlsbakk E, Friis-Møller A, Krossoy B, et al. 2007.** New species in the genus Francisella (Gammaproteobacteria; Francisellaceae); *Francisella piscicida* sp. nov. isolated from cod (*Gadus morhua*). Arch Microbiol 188: 547-550.
156. **Owens DR, Nelson SL, Addison JB. 1974.** Isolation of *Edwardsiella tarda* from swine. Appl Microb 27: 703-705.
157. **Pancholi V y Fischetti VA. 1998.** Alpha-enolase, a novel strong plasmin (ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. J Biol Chem 273: 14503-14515.
158. **Paranjpye R, Lara C, Pepe J, Pepe C, Strom M. 1998.** The type IV leader peptidase/N-methyltransferase of *Vibrio vulnificus* controls factors required for

- adherence to HEp-2 cells and virulence in Iron-overloaded mice. *Infect and Imm.* 66(12): 5659-5668.
159. **Pazzaglia G, Escalante RJ, Sack RB, Rocca C, Benavides V. 1990.** Transient intestinal colonization by multiple phenotypes of *Aeromonas* species during the first week of life. *J Clin Microbiol* 28: 1842-1846.
 160. **Pechous RD, McCarthy TR, Zahrt TC. 2009.** Working toward the future: Insights into *Francisella tularensis* pathogenesis and vaccine development. *Microb Molec Bio Rev* 73(4): 684-711.
 161. **Perera RP, Fiske RA, Johnson SK. 1998.** Histopathology of hybrid tilapias Infected with a Biotype of *Streptococcus iniae*. *J Aquatic Anim Health* 10(3): 294-299.
 162. **Phillips AD, Trabulsi LR, Dougan G, Frankel G. 1998.** *Edwardsiella tarda* induces plasma membrane ruffles on infection of HEp-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett* 161: 317-323.
 163. **Pier GB y Madin SH. 1976.** *Streptococcus iniae* sp nov, a beta-haemolytic *Streptococcus* isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. *Int J System Bacteriol* 26: 545-553.
 164. **Pirarat N, Kobayashi T, Katagiri T, Maita M, Endo M. 2006.** Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet Imm Immunopathol* 113: 339-347.
 165. **Plumb JA. 1999.** Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fish Ames: Iowa State University Press. 344 p.
 166. **Plumb JA y Evans JJ. 2006.** *Edwardsiella* septicemia. in *Aquaculture Compendium*. CAB International, Wallingford, United Kingdom. Disponible [Internet] <http://www.cabicompendium.org/ac>.
 167. **Poot-Poot WA. 2001.** Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas del tracto intestinal de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) bajo condiciones de cultivo. Tesis de Licenciatura. México: Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN Unidad Mérida. 46 p.
 168. **Ramos R y Gálvez M. 2000.** Impacto ambiental de la introducción de tilapias en la cuenca del río Piura. *Rev. Universalía. UNP.* 5(1):80-97.
 169. **Rattanachaikunsopon P y Phumkhachorn P. 2009.** Potential of chinese chive oil as a natural antimicrobial for controlling *Flavobacterium columnare* infection in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Science* 75(6): 1431-1437.
 170. **Reyes AL, Johnson CH, Spaulding PL, Stelma GN. 1987.** Oral infectivity of *Vibrio vulnificus* isolates. *J Food Prot.* 50: 1013-1016.

171. **Rhaman MH, Suzuki S, Kawai K. 2001.** The effect of temperature on *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus*. J. Appl. Ichthyol 17: 282-285.
172. **Roberts TA, Baird-Parker AC, Tompkin RB. 1996.** Aeromonas. In Microorganisms in Foods. Characteristics of Microbial Pathogens. ICMSF 5: 5-19.
173. **Roberts RJ. 2001.** The bacteriology of teleosts. In: Roberts RJ, eds. Fish pathology. 3rd ed. Edinburgh, UK: WB Saunders. p 315-321.
174. **Rodríguez LA, Ellis AE, Nieto TP. 1992.** Purification and characterization of an extracellular metalloprotease, serine protease and haemolysin of *Aeromonas hydrophila* strain B32: all are lethal for fish. Microb Pathogen. 13: 17-24.
175. **Rodríguez M, Botero E, Iregui CA, Figueroa J. 2005.** Extracción de productos extracelulares de *Aeromonas hydrophila* y sus efectos en Tilapia roja (*Oreochromis spp.*) y Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Act Biol Col 10 (2): 75-93.
176. **Romano LA y Mejía J. 2003.** Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo y a humanos. Revista AquaTIC. 18: 25-32.
177. **Ruizhang G, Xiong J, Huang W, Guo S. 2011.** Enhancement of protective immunity in European eel (*Anguilla anguilla*) against *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by a recombinant *Aeromonas* outer membrane protein Act Biochim Biophys Sin 43(1): 79-88.
178. **Sahoo PK y Mukherjee SC. 1997.** *In vitro* susceptibility of three bacterial pathogens of catfish to 23 antimicrobial agents. Indian J Fish 44: 393-397.
179. **Sahoo PK y Mukherjee SC. 2002.** The effect of dietary immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp (*Labeo rohita*). Fish Shellfish Immunol 12: 1-16.
180. **Sandoval N, Lam K, Manchego A. 2010.** Reporte de enfermedades que se han presentado y existen en las áreas de cultivo de las especies acuícolas: trucha, langostino, concha de abanico y tilapia. Ministerio de la Producción. 62 p.
181. **Savan R, Kono T, Itami T, Sakai M. 2005.** Loop-mediated isothermal amplification: an emerging technology for detection of fish and shellfish pathogens. J. Fish Dis 28: 573-581.
182. **Schmittou HR, Cremer MC, Zhang J. 2004.** Principles and practices of high density fish culture in low volume cages. VI. Fish Stress, Health and Disease. 1-11.
183. **Sebastião FA, Nomura D, Sakabe R, Pilarski F. 2011.** Hematology and protective performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) naturally infected with *Flavobacterium columnare*. Braz J Microb 42: 282-289.

184. Sendra RM, Esteve C, Alcaide E. 1997. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Aeromonas hydrophila* serogroup O:19. FEMS Microbiol. Lett. 157: 123-129.
185. Sha J, Kozlova EV, Chopra AK. 2002. Role of Various Enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-Induced Gastroenteritis: Generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. Infect Immun. 70: 1924-1935.
186. Shelby RA, Shoemaker J, Evans J, Klesius PH. 2001. Development of an indirect ELISA to detect humoral response to *Streptococcus iniae* of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. J Appl Aquacul 11: 35-44.
187. Shen YR y Chen JD. 2005. Expression of virulent genes of *Edwardsiella tarda* correlated with mortality of diseased-fish infection. J Fish Soc Taiw. 32: 80-81.
188. Shoemaker CA, Xu DH, Evans JJ, Klesius PH. 2006. Parasites and diseases. In: Lim C, Webster CD, eds. Tilapia: Biology, Culture, and Nutrition. New York, USA: Haworth Press Inc. p 561-582.
189. Shotts EB y Rimler R. 1973. Medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. J Appl Microb. 26: 550 - 553.
190. Shutou K, Kanai K, Yoshikoshi K. 2007. Virulence attenuation of capsular polysaccharide-deleted mutants of *Streptococcus iniae* in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathol 42: 42-48.
191. Slaven EM, Lopez FA, Hart SM, Sanders CV. 2001. Myonecrosis caused by *Edwardsiella tarda*: A case report and case series of extra-intestinal *E. tarda* infections. Clinic Infect Dis 32:1430-1433.
192. Soto E, Hawke J, Fernandez D, Morales JA. 2009. *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Costa Rica. J Fish Dis. 32: 713-722.
193. Soto E. 2010. *In vivo* and *in vitro* pathogenesis of *Francisella asiatica* in tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). [Internet]. Disponible en: <http://www.etd.lsu.edu/docs/available/etd-06252010-160336/.../DissertationESOTO.pdf>.
194. Soto E, Fernandez D, Thune R, Hawke J. 2010a. Interaction of *Francisella asiatica* with Tilapia (*Oreochromis niloticus*) innate immunity. Infection and Immunity. 78(5): 2070-2078.
195. Soto E, Endris R, Hawke J. 2010b. *In vitro* and *in vivo* efficacy of florfenicol for treatment of *Francisella asiatica* infection in tilapia. Antimicrob Agents Chemother 54(11): 4664-4670
196. Srinivasa Rao PS, Lim TM, Leung KY. 2003. Functional genomics approach to the identification of virulent genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis. Infect Immun 71: 1343-1351.

197. **Srinivasa Rao PS, Yamada Y, Tan YP, Leung KY. 2004.** Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. *Mol Microbiol* 53: 573-586.
198. **Suprpto H, Hara T, Nakai T, Muroga K. 1996.** Purification of a lethal toxin of *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathol* 31: 203-207.
199. **Starliper CE. 2008.** General and specialized media routinely employed for primary isolation of bacterial pathogens of fishes. *J Wildlife Dis* 44(1): 121-132.
200. **Swain P, Nayak S K, Sahu A, Meher PK, Mishra BK. 2002.** High antigenic cross-reaction among the bacterial species responsible for diseases of cultured freshwater fishes and strategies to overcome it for specific serodiagnosis. *Comp Immunol Microbiol* 26: 199-211.
201. **Tan YP, Zheng J, Tung SL, Rosenshine I, Leung KY. 2005.** Role of type III secretion in *Edwardsiella tarda* virulence. *Microbiology*. 151: 2301-2313.
202. **Tan E, Low KW, Wong WS, Leung KY. 1998.** Internalization of *Aeromonas hydrophila* by fish epithelial cells can be inhibited with a tyrosine kinase inhibitor. 144: 299-307.
203. **Taoka Y, Maeda H, Jo J-Y, Kim S-M, Park S-I, et al. 2006.** Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish. Sci* 72: 755-766.
204. **Tavares-Dias MT, Martins LM, Moraes FR. 2001.** Parasitic fauna of cultivated fishes in feed fishing farm of Franca, Sao Paulo, Brazil. I. Protozoans. *Rev Bras Zoo* 18: 67-69.
205. **Thomas LV, Gross RJ, Cheasty T, Rowe B. 1990.** Extended serogrouping scheme for motile, mesophilic *Aeromonas* species. *J Clin Microbiol* 28: 980-984.
206. **Thune RL, Johnson MC, Graham TE, Amborski RL. 1986.** *Aeromonas hydrophila* B-haemolysin: Purification and examination of its role in virulence in O-group channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Fish Dis* 9: 55-61.
207. **Thune RL, Stanley LA, Cooper RK. 1993.** Pathogenesis of gram-negative bacterial infections in warmwater fish. *Annual Review of Fish Dis* 3: 37-68.
208. **Ullah MA y Arai T. 1983a.** Pathological activities of the naturally occurring strains of *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathol* 18: 65-70.
209. **Ullah MA y Arai T. 1983b.** Exotoxins produced by *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathol* 18: 71-75.
210. **Van Damme LR y Vandepitte J. 1980.** Frequent isolation of *Edwardsiella tarda* and *Plesiomonas shigelloides* from healthy Zairese freshwater fish: A possible source of sporadic diarrhea in the tropics. *Appl Environ Microb* 39: 475-479.

211. Vandamme P, Devriese LA, Pot B, Kersters K, Melin P. 1997. *Streptococcus difficile* is a nonhaemolytic group B, type Ib Streptococcus. Int J System Bacteriol 47: 81-85.
212. Vásquez-Piñeros M, Rondón-Barragán I, Restrepo-Betancur L, Eslava-Mocha P. 2010. Estudio clínico y hematológico de una infección experimental con *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en tilapia, *Oreochromis* spp. Orinoquia. 14(1): 33-44.
213. Ventura MT y Grizzle JM. 1987. Evaluation of portals of entry of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. Aquacult 65: 205-214.
214. Verjan N, Hirono I, Aoki T. 2005. Genetic loci of major antigenic protein genes of *Edwardsiella tarda*. Appl Environ Microbiol 71: 5654-5658.
215. Vivekanandhan G, Savithamani K, Hatha AA, Lakshmanaperumalsamy P. 2002. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from market fish and prawn of South India. International J Food Microbiol 76: 165-168.
216. Vojtech LN, Sanders GE, Conway C, Ostland V, Hansen JD. 2009. Host immune response and acute disease in a zebrafish model of Francisella pathogenesis. Infect. Immun. 77: 914-925.
217. Wallace L J, White FH, Gore HL. 1966. Isolation of *Edwardsiella tarda* from a sea lion and two alligators. J Am Vet Medic Assoc 881-882.
218. White FH, Simpson CF, Williams LE. 1973. Isolation of *Edwardsiella tarda* from aquatic animal species and surface waters in Florida. J Wildlife Dis 9: 204-208.
219. Wiedenmayer AA. 2006. A comparative study of the immunological properties of extracellular products between virulent and less virulent *Edwardsiella tarda*. A Dissertation.
[Internet]. Disponible en: http://etd.auburn.edu/etd/bitstream/handle/10415/620/WIEDENMAYER_ALYSSA_54.pdf?sequence=1.
220. Wright A, Simpson L, Oliver L, Morris J. 1990. Phenotypic evaluation of capsular transposon mutants of *Vibrio vulnificus*. Infect Imm 58(6): 1769-1773.
221. Wyatt LE, Nickelson R, Vanderzant C. 1979. *Edwardsiella tarda* in freshwater catfish and their environment. Appl Environ Microbiol 38: 710-714.
222. Yamada Y y Wakabayashi H 1999. Identification of fish pathogenic strains belonging to genus *Edwardsiella* by sequence analysis of sodB. Fish Pathol 34: 145-150.
223. Yardimci B y Aydin Y. 2011. Pathological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Vet Fak Derg 58: 47-54.
224. Yasunobu H, Arikawa Y, Fumtsuka-Uozumi K, Domo M, Iida T, et al. 2006. Induction of hemagglutination activity of *Edwardsiella tarda* by sodium chloride. Fish Pathol 41: 29-34.

225. **Yin G, Jeney G, Racz T, Xu P, Jun X, et al. 2006.** Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquacul* 253: 39-47.
226. **Yin G, Ardo L, Thompson KD, Adams A, Jeney Z, et al. 2009.** Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol* 26: 140-145.
227. **Yoshida S-I, Ogawa M, Mizuguchi Y. 1985.** Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. *Infect Imm.* 47(2): 446-451.
228. **Yu L, Yuan L, Feng H, Li SF. 2004.** Determination of the bacterial pathogen *Edwardsiella tarda* in fish species by capillary electrophoresis with blue light-emitting diode-induced fluorescence. *Electrophoresis*. 25: 3139-3144.
229. **Zhang YL, Ong CT, Leung KY. 2000.** Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. *Microbial* 146: 999-1009.
230. **Zhang X-J, Fang H, Chen C-Z, Ge M-X, Wang X-Y. 2005.** Sensitivity of pathogenic *Edwardsiella tarda* isolated from flounder (*Paralichthys olivaceus*) to some antimicrobial agents. *Fish Sci* 24: 15-18.
231. **Zhang Y y Arias CR. 2009.** Identification and characterization of *gtf*, *norB* and *trx* genes in *F. columnare*. *J Microbial Biochem Tech* 1(1): 64-71.
232. **Zheng D, Mai K, Liu S, Limin C, Liufu Z, et al. 2004.** Effect of temperature and salinity on virulence of *Edwardsiella tarda* to Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temmincket Schlegel). *Aqua Res* 35: 494-500.
233. **Zheng J, Tung SL, Leung KY. 2005.** Regulation of a type III and a putative secretion system in *Edwardsiella tarda* by EsrC is under the control of a two-component system, EsrA–EsrB. *Infect Immun* 73: 4127-4137.
234. **Zhu Z-C, Shi X-G, Zhang S-J, Jiang G-J, Xing Z-B, et al. 2006.** The pathogenic bacteria of the ascites in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Sci* 7: 325-329.
235. **Zinkernagel AS, Timmer AM, Pence MA, Locke JB, Buchanan JT, et al. 2008.** The IL-8 protease SpyCEPD/ScpC of group A streptococcus promotes resistance to neutrophil killing. *Cell Host Microb* 4: 170-178.

XII. APÉNDICES

Apéndice 1. Enfermedades y medidas de control en *O. niloticus* (FAO, 2006)

Enfermedad	Agente	Medidas
Septicemia por Aeromonas móviles (MAS)	<i>A. hydrophila</i>	Inmersión indefinida en solución de KMnO ₄ a 2 - 4 mg/litro; o de 4 -10 mg/litro durante una hora, antibióticos (en USA se requiere permiso de uso 'extra-label'), e.g. Terramycin® en el alimento en concentración de 50 mg/kg pez/día durante 12 - 14 días, 21 días de impedimento comercial.
Vibriosis	<i>V. anguillarum</i> y otras especies	Antibióticos en alimento
Columnaris	<i>F. columnare</i>	KMnO ₄ como en el caso de MAS; inmersión indefinida con CuSO ₄ en concentración de 0,5 -3 mg/litro, dependiendo de la alcalinidad
Edwardsiellosis	<i>E. tarda</i>	Antibióticos en alimento
Estreptococosis	<i>S. iniae</i>	Antibiótico en alimentos, e.g. Erytromicina en concentración de 50 mg/kg pez/día durante 12 días (en USA requiere permiso de uso 'extra-label')

A QUICK REFERENCE GUIDE TO:



Approved Drugs for Use in Aquaculture

Product name & supplier	Species	Indications	Dosing	Limitations & comments
AGUAFLOX® Farnam Companies, Inc. 1-800-331-1197	Catfish	Control of respiratory tract infections caused by <i>Aeromonas</i> spp. and <i>Yersinia</i> spp.	10 mg/kg body weight PO, twice daily for 10 days	• Do not use in fish with known kidney disease • Do not use in fish with known liver disease • Do not use in fish with known heart disease
AGUAFLOX® Farnam Companies, Inc. 1-800-331-1197	Channel catfish	Control of respiratory tract infections caused by <i>Aeromonas</i> spp. and <i>Yersinia</i> spp.	10 mg/kg body weight PO, twice daily for 10 days	• Do not use in fish with known kidney disease • Do not use in fish with known liver disease • Do not use in fish with known heart disease

Product name & supplier	Species	Indications	Dosing	Limitations & comments
AGUAFLOX® Farnam Companies, Inc. 1-800-331-1197	Channel catfish	Control of respiratory tract infections caused by <i>Aeromonas</i> spp. and <i>Yersinia</i> spp.	10 mg/kg body weight PO, twice daily for 10 days	• Do not use in fish with known kidney disease • Do not use in fish with known liver disease • Do not use in fish with known heart disease

Product name & supplier	Species	Indications	Dosing	Limitations & comments
AGUAFLOX® Farnam Companies, Inc. 1-800-331-1197	Channel catfish	Control of respiratory tract infections caused by <i>Aeromonas</i> spp. and <i>Yersinia</i> spp.	10 mg/kg body weight PO, twice daily for 10 days	• Do not use in fish with known kidney disease • Do not use in fish with known liver disease • Do not use in fish with known heart disease

Product name & supplier	Species	Indications	Dosing	Limitations & comments
AGUAFLOX® Farnam Companies, Inc. 1-800-331-1197	Channel catfish	Control of respiratory tract infections caused by <i>Aeromonas</i> spp. and <i>Yersinia</i> spp.	10 mg/kg body weight PO, twice daily for 10 days	• Do not use in fish with known kidney disease • Do not use in fish with known liver disease • Do not use in fish with known heart disease

Product name & supplier	Species	Indications	Dosing	Limitations & comments
AGUAFLOX® Farnam Companies, Inc. 1-800-331-1197	Channel catfish	Control of respiratory tract infections caused by <i>Aeromonas</i> spp. and <i>Yersinia</i> spp.	10 mg/kg body weight PO, twice daily for 10 days	• Do not use in fish with known kidney disease • Do not use in fish with known liver disease • Do not use in fish with known heart disease

Product name & supplier	Species	Indications	Dosing	Limitations & comments
AGUAFLOX® Farnam Companies, Inc. 1-800-331-1197	Channel catfish	Control of respiratory tract infections caused by <i>Aeromonas</i> spp. and <i>Yersinia</i> spp.	10 mg/kg body weight PO, twice daily for 10 days	• Do not use in fish with known kidney disease • Do not use in fish with known liver disease • Do not use in fish with known heart disease

AGUAFLOX® is a synthetic antibiotic that is effective against a wide range of bacterial pathogens. It is indicated for the treatment of respiratory tract infections in channel catfish. The drug is administered orally in the form of a feed supplement. The recommended dosage is 10 mg/kg body weight, administered twice daily for 10 days. The drug is contraindicated in fish with known kidney, liver, or heart disease.

Product name & supplier	Species	Indications	Dosing	Limitations & comments
AGUAFLOX® Farnam Companies, Inc. 1-800-331-1197	Channel catfish	Control of respiratory tract infections caused by <i>Aeromonas</i> spp. and <i>Yersinia</i> spp.	10 mg/kg body weight PO, twice daily for 10 days	• Do not use in fish with known kidney disease • Do not use in fish with known liver disease • Do not use in fish with known heart disease

Product name & supplier	Species	Indications	Dosing	Limitations & comments
AGUAFLOX® Farnam Companies, Inc. 1-800-331-1197	Channel catfish	Control of respiratory tract infections caused by <i>Aeromonas</i> spp. and <i>Yersinia</i> spp.	10 mg/kg body weight PO, twice daily for 10 days	• Do not use in fish with known kidney disease • Do not use in fish with known liver disease • Do not use in fish with known heart disease

Product name & supplier	Species	Indications	Dosing	Limitations & comments
AGUAFLOX® Farnam Companies, Inc. 1-800-331-1197	Channel catfish	Control of respiratory tract infections caused by <i>Aeromonas</i> spp. and <i>Yersinia</i> spp.	10 mg/kg body weight PO, twice daily for 10 days	• Do not use in fish with known kidney disease • Do not use in fish with known liver disease • Do not use in fish with known heart disease

AGUAFLOX® is a synthetic antibiotic that is effective against a wide range of bacterial pathogens. It is indicated for the treatment of respiratory tract infections in channel catfish. The drug is administered orally in the form of a feed supplement. The recommended dosage is 10 mg/kg body weight, administered twice daily for 10 days. The drug is contraindicated in fish with known kidney, liver, or heart disease.